

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平 8 - 8 4 5 8 6

(43) 公開日 平成 8 年 (1996) 4 月 2 日

(51) Int. Cl. ⁶

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C12N 9/24

C07H 1/00

3/06

21/04

C12N 1/21

B

8828-4B

審査請求 未請求 請求項の数 29 F D (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平 7 - 1 8 9 7 0 6

(22) 出願日 平成 7 年 (1995) 7 月 4 日

(31) 優先権主張番号 特願平 6 - 1 9 0 1 8 3

(32) 優先日 平 6 (1994) 7 月 2 1 日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 0 0 0 1 5 5 9 0 8

株式会社林原生物化学研究所

岡山県岡山市下石井 1 丁目 2 番 3 号

(72) 発明者 丸田 和彦

岡山県岡山市桑野 5 2 5 番 3 - 2 1 4 号

(72) 発明者 久保田 倫夫

岡山県岡山市四御神 1 番 3 0

(72) 発明者 杉本 利行

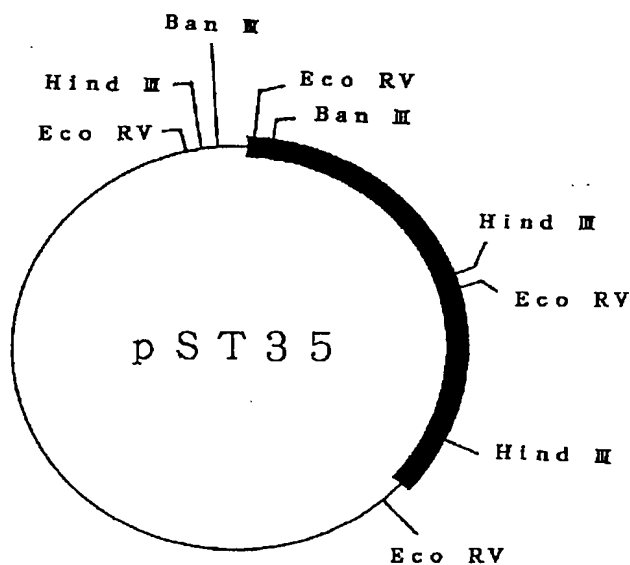
岡山県岡山市東畦 6 9 5 番 4 4 号

(54) 【発明の名称】還元性澱粉糖から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する組換え型耐熱性酵素

(57) 【要約】

【目的】還元性澱粉糖から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する組換え型耐熱性酵素、その組換え型耐熱性酵素をコードする DNA とその DNA を含む組換え DNA と形質転換体、その形質転換体を利用する組換え型耐熱性酵素の製造方法、さらには、組換え型耐熱性酵素による還元性澱粉糖の酵素的変換方法を提供する。

【構成】特定の理化学的性質を有する組換え型耐熱性酵素と、その組換え型耐熱性酵素をコードする DNA と、その DNA と自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換え DNA と、その組換え DNA を適宜宿主に導入してなる形質転換体と、その形質転換体を培養し、培養物から組換え型耐熱性酵素を採取してなる組換え型耐熱性酵素の製造方法と、特定の還元性澱粉糖に組換え型耐熱性酵素を作用させて末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成させる工程を含んでなる還元性澱粉糖の酵素的変換方法を要旨とする。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の理化学的性質を有する組換え型耐熱性酵素。

(1) 作用

グルコース重合度3以上の還元性澱粉糖から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する。

(2) 分子量

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により測定すると、分子量約69,000乃至79,000ダルトンを示す。

(3) 等電点

等電点電気泳動法により測定すると、約5.4乃至6.4に等電点を示す。

(4) 熱安定性

水溶液(pH7.0)中、85℃で60分間インキュベートしても実質的に失活しない。

【請求項2】 配列表における配列番号1に示すN末端からのアミノ酸配列又はそれに相相同的なアミノ酸配列を有する請求項1に記載の組換え型耐熱性酵素。

【請求項3】 請求項1乃至2に記載の組換え型耐熱性酵素をコードするDNA。

【請求項4】 配列表における配列番号2に示す5'末端からの塩基配列若しくはそれに相相同的な塩基配列又はそれらに相補的な塩基配列を有する請求項3に記載のDNA。

【請求項5】 遺伝子コードの縮重に基づき、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を變えることなく、配列表における配列番号2に示す塩基配列における塩基の1個又は2個以上を他の塩基で置換した請求項3又は4に記載のDNA。

【請求項6】 スルフォロブス属の微生物に由来する請求項3、4又は5に記載のDNA。

【請求項7】 請求項1乃至2に記載の組換え型耐熱性酵素をコードするDNAと、自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換えDNA。

【請求項8】 DNAが配列表における配列番号2に示す5'末端からの塩基配列若しくはそれに相相同的な塩基配列又はそれらに相補的な塩基配列を有する請求項7に記載の複製可能な組換えDNA。

【請求項9】 DNAが、遺伝子コードの縮重に基づき、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を變えることなく、配列表における配列番号2に示す塩基配列における塩基の1個又は2個以上を他の塩基で置換した請求項7又は8に記載の複製可能な組換えDNA。

【請求項10】 DNAがスルフォロブス属の微生物に由来する請求項7、8又は9に記載の複製可能な組換えDNA。

【請求項11】 自律複製可能なベクターがプラスミドベクターBluescript II SK(+)又はpKK223-3である請求項7、8、9又は10に記

載の複製可能な組換えDNA。

【請求項12】 請求項1乃至2に記載の組換え型耐熱性酵素をコードするDNAと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換えDNAを適宜宿主に導入してなる形質転換体。

【請求項13】 DNAが配列表における配列番号2に示す5'末端からの塩基配列若しくはそれに相相同的な塩基配列又はそれらに相補的な塩基配列を有する請求項12に記載の形質転換体。

10 【請求項14】 DNAが、遺伝子コードの縮重に基づき、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を變えることなく、配列表における配列番号2に示す塩基配列における塩基の1個又は2個以上を他の塩基で置換した請求項12又は13に記載の形質転換体。

【請求項15】 DNAがスルフォロブス属の微生物に由来する請求項12、13又は14に記載の形質転換体。

【請求項16】 自律複製可能なベクターがプラスミドベクターBluescript II SK(+)又はpKK223-3である請求項12、13、14又は15に記載の形質転換体。

【請求項17】 宿主が大腸菌である請求項12、13、14、15又は16に記載の形質転換体。

【請求項18】 請求項1乃至2に記載の組換え型耐熱性酵素をコードするDNAと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換えDNAを適宜宿主に導入してなる形質転換体を培養し、培養物から組換え型耐熱性酵素を採取してなる組換え型耐熱性酵素の製造方法。

30 【請求項19】 DNAが配列表における配列番号2に示す5'末端からの塩基配列若しくはそれに相相同的な塩基配列又はそれらに相補的な塩基配列を有する請求項18に記載の組換え型耐熱性酵素の製造方法。

【請求項20】 DNAが、遺伝子コードの縮重に基づき、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を變えることなく、配列表における配列番号2に示す塩基配列における塩基の1個又は2個以上を他の塩基で置換したものである請求項18又は19に記載の組換え型耐熱性酵素の製造方法。

【請求項21】 DNAがスルフォロブス属の微生物に由来する請求項18、19又は20に記載の組換え型耐熱性酵素の製造方法。

【請求項22】 自律複製可能なベクターがプラスミドベクターBluescript II SK(+)又はpKK223-3である請求項18、19、20又は21に記載の組換え型耐熱性酵素の製造方法。

【請求項23】 宿主が大腸菌である請求項18、19、20、21又は22に記載の組換え型耐熱性酵素の製造方法。

【請求項24】 培養物中の組換え型耐熱性酵素を遠心分離、濾過、濃縮、塩析、透析、分別沈澱、イオン交換

クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル電気泳動及び／又は等電点電気泳動により採取する請求項 1 8、1 9、2 0、2 1、2 2 又は 2 3 に記載の組換え型耐熱性酵素の製造方法。

【請求項 2 5】 グルコース重合度 3 以上の還元性澱粉糖に請求項 1 乃至 2 に記載の組換え型耐熱性酵素を作用させて末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成させる工程を含んでなる還元性澱粉糖の酵素的変換方法。

【請求項 2 6】 還元性澱粉糖が澱粉又は澱粉質を酸及び／又はアミラーゼにより加水分解して得られたものである請求項 2 5 に記載の還元性澱粉糖の酵素的変換方法。

【請求項 2 7】 還元性澱粉糖がマルトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース及び／又はマルトヘプタオースである請求項 2 5 又は 2 6 に記載の還元性澱粉糖の酵素的変換方法。

【請求項 2 8】 還元性澱粉糖濃度が 5 0 % (w/w) 以下の水溶液に組換え型耐熱性酵素を共存せしめ、5 5 20 °C を越える温度で作用させる請求項 2 5、2 6 又は 2 7 に記載の還元性澱粉糖の酵素的変換方法。

【請求項 2 9】 非還元性糖質が α -グルコシルトレハロース、 α -マルトシルトレハロース、 α -マルトリオシルトレハロース、 α -マルトテトラオシルトレハロース又は α -マルトペンタオシルトレハロースである請求項 2 5、2 6、2 7 又は 2 8 に記載の還元性澱粉糖の酵素的変換方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【産業上の利用分野】 この発明は、グルコース重合度 3 以上の還元性澱粉糖から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する組換え型耐熱性酵素に関するものである。

【0 0 0 2】

【従来の技術】 トレハロースは、グルコース 2 分子が還元性基同士結合した二糖類であり、天然には細菌、真菌、藻類、昆虫などに微量存在する。トレハロースは分子中に還元性基を持たないので、アミノ酸類の存在下で加熱しても褐変反応を起こすことがなく、着色や変質の懸念なく飲食物を甘味付けできる利点がある。しかしながら、従来の方法では所望量を入手するのが難しく、実際に飲食物の甘味付けに使われることは殆どなかった。

【0 0 0 3】 これまでの製造方法は、微生物の菌体を利用する方法と、糖質に複合酵素系を作用させる方法とに大別される。前者の方法は、特開昭 5 0 - 1 5 4 4 8 5 号公報などにも見られるように、細菌、酵母などの微生物を栄養培地で増殖させ、主として菌体からトレハロースを採取するものである。一方、後者の方法は、特開昭 5 8 - 2 1 6 6 9 5 号公報などにもみられるように、基

質にマルトースを使用し、これにマルトース・フォスフォリラーゼとトレハロース・フォスフォリラーゼからなる複合酵素系を作用させ、生成したトレハロースを系外に取出すものである。前者の方法は、微生物そのものの増殖は比較的容易なものの、菌体に含まれるトレハロースが高々 1 5 % (w/w) と僅少であるという問題があった。後者の方法は、トレハロースそのものの分離は比較的容易なものの、反応自体が 2 種類の酵素による平衡反応であり、しかも、その平衡が常時グルコース磷酸側に傾いていることから、基質を高濃度にして反応させ、トレハロースの収量を上げるのが原理的に難しかった。

【0 0 0 4】 斯かる状況に鑑み、本発明者が、澱粉糖からトレハロース構造を有する糖質を生成する酵素につき鋭意検索したところ、リゾビウム属やアルスロバクター属に属するある種の微生物がグルコース重合度 3 以上の還元性澱粉糖から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成するという、従来未知の全く新規な酵素を産生することを見出し、特願平 5 - 3 4 9 2 1 6 号明細書に開示した。そして、この非還元性糖質は、グルコアミラーゼや α -グルコシダーゼを作用させると、容易にトレハロースを与えることも見出した。

【0 0 0 5】 ところが、上記微生物が産生する酵素は、いずれも 4 0 °C 付近に至適温度を有しており、実際にトレハロースの製造に使用するには熱安定性にやや難のあることが判明した。すなわち、斯界においては、澱粉や澱粉質を糖化するには、一般に、5 5 °C を上回る温度で反応させるのが望ましいとされており、これは、5 5 °C 以下で糖化すると雑菌汚染が顕著となり、反応物の pH が低下して酵素が失活したり、これにより、大量の基質が未反応のまま残存したりすることによる。敢えて熱安定性に劣る酵素で糖化しようとする、pH の推移に多大の注意を払わなければならない、万一、pH が顕著に低下した場合には、反応物にアルカリ等を加えて可及的速やかに pH を上昇させるなどの対策を講じなければならない。

【0 0 0 6】 斯かる状況に鑑み、本発明者が、斯かる作用ある耐熱性酵素につき引続き検索したところ、スルフォロブス・アシドカルダリウス (ATCC 33909) を始めとするスルフォロブス属の微生物が産生する酵素は、5 5 °C を上回る温度で反応させても、実質的に失活することなく、グルコース重合度 3 以上の還元性澱粉糖から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を効率的に生成することを見出した。しかしながら、これら微生物はいずれも酵素の産生能が充分でなく、トレハロースや末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を大規模に製造しようとする、微生物を大量に培養しなければならないという問題がある。

【0 0 0 7】 一方、昨今の組換え DNA 技術の進歩には目覚ましいものがある。今日では、全アミノ酸配列が解明されていない酵素であっても、これをコードする遺伝

子を単離し、その塩基配列を解明できれば、その酵素をコードするDNAを含む組換えDNAを作製し、これを微生物や動植物の細胞に導入して得られる形質転換体を培養することにより、比較的容易に所望量の酵素が取得できるようになった。斯かる状況に鑑み、上記耐熱性酵素をコードする遺伝子を突き止め、その塩基配列を解明するのが急務となっている。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】この発明の目的は、組換えDNA技術を応用することにより、グルコース重合度3以上の還元性澱粉糖から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する組換え型耐熱性酵素を創製することにある。

【0009】この発明の別の目的は、その創製された組換え型耐熱性酵素をコードするDNAを提供することにある。

【0010】この発明のさらに別の目的は、斯かるDNAを含む複製可能な組換えDNAを提供することにある。

【0011】この発明のさらに別の目的は、斯かる組換えDNAを導入した形質転換体を提供することにある。

【0012】この発明のさらに別の目的は、斯かる形質転換体を利用する、組換え型耐熱性酵素の製造方法を提供することにある。

【0013】この発明のさらに別の目的は、組換え型耐熱性酵素を利用する、グルコース重合度3以上の還元性澱粉糖を末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質に変換する方法を提供することにある。

【0014】

【課題を解決するための手段】この発明は、前記第一の課題を、下記の理化学的性質を有する組換え型耐熱性酵素により解決するものである。

(1) 作用

グルコース重合度3以上の還元性澱粉糖から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する。

(2) 分子量

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により測定すると、分子量約69,000乃至79,000ダルトンを示す。

(3) 等電点

等電点電気泳動法により測定すると、約5.4乃至6.4に等電点を示す。

(4) 熱安定性

水溶液(pH7.0)中、85℃で60分間インキュベートしても、実質的に失活しない。

【0015】この発明は、前記第二の課題を、上記組換え型耐熱性酵素をコードするDNAにより解決するものである。

【0016】この発明は、前記第三の課題を、上記組換え型耐熱性酵素をコードするDNAと自律複製可能なベ

クターを含んでなる複製可能な組換えDNAにより解決するものである。

【0017】この発明は、前記第四の課題を、上記組換え型耐熱性酵素をコードするDNAと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換えDNAを適宜宿主に導入してなる形質転換体により解決するものである。

【0018】この発明は、前記第五の課題を、上記組換え型耐熱性酵素をコードするDNAと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換えDNAを適宜宿主に導入してなる形質転換体を培養し、培養物から組換え型耐熱性酵素を採取してなる組換え型耐熱性酵素の製造方法により解決するものである。

【0019】この発明は、前記第六の課題を、グルコース重合度3以上の還元性澱粉糖に上記組換え型耐熱性酵素を作用させて末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成させる工程を含んでなる還元性澱粉糖の酵素的変換方法により解決するものである。

【0020】

【作用】この発明の組換え型耐熱性酵素は、55℃を越える温度で反応させても、実質的に失活することなく、グルコース重合度3以上の還元性澱粉糖から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する。

【0021】この発明のDNAは、自律複製可能な適宜ベクターに挿入して複製可能な組換えDNAとし、これを、通常、当該酵素を産生しないけれども、容易に増殖させることのできる適宜宿主に導入して形質転換体とすることにより、当該酵素の産生を発現する。

【0022】この発明の組換えDNAは、通常、当該酵素を産生しないけれども、容易に増殖させることのできる適宜宿主に導入して形質転換体とすることにより、当該酵素の産生を発現する。

【0023】この発明の形質転換体は、培養すると、当該酵素を産生する。

【0024】斯かる形質転換体をこの発明の製造方法にしたがって培養すれば、所望量の当該酵素が容易に得られる。

【0025】この発明の酵素的変換方法により、グルコース重合度3以上の還元性澱粉糖は、末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質に変換される。

【0026】この発明は、グルコース重合度3以上の還元性澱粉糖から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する、従来未知の全く新規な耐熱性酵素の発見に基づくものである。斯かる酵素はスルフォロブス・アシドカルダリウス(ATCC33909)の培養物から得ることができ、本発明者がカラムクロマトグラフィーを中心とする種々の精製方法を組合わせてこの酵素を単離し、その性質・性状を調べたところ、その本質はポリペプチドであり、次のような理化学的性質を有することが判明した。

(1) 作用

グルコース重合度3以上の還元性澱粉糖から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する。

(2) 分子量

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により測定すると、分子量約69,000乃至79,000ダルトンを示す。

(3) 等電点

等電点電気泳動法により測定すると、約5.4乃至6.4に等電点を示す。

(4) 至適温度

pH5.5で60分間反応させると、75℃付近に至適温度を示す。

(5) 至適pH

60℃で60分間反応させると、pH5.0乃至5.5に至適pHを示す。

(6) 熱安定性

pH7.0で60分間インキュベートすると、85℃付近まで安定である。

(7) pH安定性

4℃で24時間インキュベートすると、pH4.0乃至9.5まで安定である。

【0027】次に、スルフォロブス・アシドカルダリウス(ATCC33909)が産生する耐熱性酵素の理化学的性質を解明すべく行った実験について説明する。

【0028】

【実験例1 精製酵素の調製】500ml容フラスコに0.1% (w/v) ポリペプトン、0.1% (w/v) 酵母エキス、0.2% (w/v) 硫酸アンモニウム、0.05% (w/v) 燐酸二水素カリウム、0.02% (w/v) 硫酸マグネシウム七水塩、0.02% (w/v) 塩化カリウム及び水からなる液体培地を約100mlずつとり、120℃で20分間オートクレーブして滅菌し、冷却後、硫酸を加えてpH3.0に調整した。この液体培地にスルフォロブス・アシドカルダリウス(ATCC33909)を接種し、75℃、130rpmで24時間回転振盪培養して第一の種培養液を得た。10l容ファーマンターに上記と同一組成の液体培地を約5lとり、同様に滅菌し、75℃まで冷却し、pH3.0に調整後、第一の種培養液を1% (v/v) 接種し、75℃、通気量500ml/分で24時間通気攪拌培養して第二の種培養液を得た。その後、300l容ファーマンターに上記と同一組成の液体培地を約250lとり、同様に滅菌し、75℃まで冷却し、pH3.0に調整後、第二の種培養液を1% (v/v) 接種し、75℃、通気量100l/分で42時間通気攪拌培養した。

【0029】約170lの培養物をSF膜により膜濾過し、遠心分離して得られた湿重量約258gの菌体を10mM燐酸緩衝液(pH7.0)300mlに浮遊させ、超音波を印加して菌体を破碎した。破碎物を10,000rpmで30分間遠心分離し、得られた約300

mlの上清に硫酸アンモニウムを70%飽和になるように加え、4℃で24時間静置後、10,000rpmで30分間遠心分離した。沈澱部を採取し、適量の10mMトリス-塩酸緩衝液(pH8.5)に溶解し、新鮮な同じ緩衝液に対して24時間透析後、10,000rpmで30分間遠心分離して酵素活性ある約600mlの上清を得た。

【0030】この上清を略二等分し、それぞれ別々に、予め10mMトリス-塩酸緩衝液(pH8.5)で平衡化させておいた東ソー製イオン交換クロマトグラフィー用ゲル『DEAE-トヨパール』約350mlのカラムに負荷し、0Mから0.3Mに上昇する塩化ナトリウムの濃度勾配下、カラムに10mMトリス-塩酸緩衝液(pH8.5)を通液した。塩化ナトリウム濃度0.1M付近で溶出した酵素活性ある画分を採取し、1M硫酸アンモニウムを含む10mMトリス-塩酸緩衝液(pH8.5)に対して10時間透析し、10,000rpmで30分間遠心分離して不溶物を除去した後、予め1M硫酸アンモニウムを含む10mMトリス-塩酸緩衝液(pH8.5)で平衡化させておいた東ソー製疎水クロマトグラフィー用ゲル『ブチルトヨパール650』約350mlのカラムに負荷し、1Mから0Mに下降する硫酸アンモニウムの濃度勾配下、カラムに10mMトリス-塩酸緩衝液(pH8.5)を通液した。

【0031】硫酸アンモニウム濃度0.8M付近で溶出した酵素活性ある画分を採取し、0.2M塩化ナトリウムを含む10mMトリス-塩酸緩衝液(pH8.5)に対して16時間透析し、10,000rpmで30分間遠心分離して不溶物を除去した後、予め0.2M塩化ナトリウムを含む10mMトリス-塩酸緩衝液(pH8.5)で平衡化させておいたセブラコル製ゲル濾過クロマトグラフィー用ゲル『ウルトロゲルAcA44』約350mlのカラムに通液した。溶出液から酵素活性ある画分を採取し、10mMトリス-塩酸緩衝液(pH8.5)に対して16時間透析し、10,000rpmで30分間遠心分離して不溶物を除去した後、予め10mMトリス-塩酸緩衝液(pH8.5)で平衡化させておいたファルマシア製イオン交換クロマトグラフィー用ゲル『Mono Q』約10mlのカラムに負荷し、0Mから0.2Mに上昇する塩化ナトリウムの濃度勾配下、カラムに10mMトリス-塩酸緩衝液(pH8.5)を通液した。そして、塩化ナトリウム濃度0.1M付近で溶出した酵素活性ある画分を採取し、以下の実験に供した。このようにして調製した精製酵素の比活性は約81単位/mg蛋白質であり、収量は培養物1l当たり約0.24単位であった。

【0032】常法により、この精製酵素を7.5% (w/v) ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動したところ、ゲル上には酵素活性を伴う実質的に単一のパンドが観察され、精製酵素が極めて高純度であることが窺わ

れた。

【0033】なお、この発明を通じて、耐熱性酵素の活性は、次の方法により測定した活性値（単位）で表示する。すなわち、基質としてマルトペンタオースを1.25%（w/v）含む20mM酢酸緩衝液（pH5.5）4mlに適宜希釈した酵素液を1ml加え、60℃で60分間インキュベートして反応させた後、100℃で30分間加熱して反応を停止させる。反応物を1mlとり、脱イオン水で10倍希釈した後、ソモギーネルソン法により還元力を測定する。同時に、予め100℃で30分間加熱して失活させておいた酵素液を使用する系を設け、上記と同様に処置して対照とする。耐熱性酵素の1単位とは、上記反応条件下において、1分間にマルトペンタオース1μmolに相当する還元力を消失させる酵素量と定義する。

【0034】

【実験例2 耐熱性酵素の理化学的性質】

【0035】

【実験例2-1 作用】基質としてグルコース、マルトース、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース又はマルトヘプタオースを10%（w/v）含む水溶液を調製し、これに実験例1で調製した精製酵素を基質固形分1g当たり2単位加え、60℃、pH5.5で48時間反応させた。反応物を常法により脱塩後、和光純薬工業製高速液体クロマトグラフィー用カラム『ワコービーズWB-T-330』を使用する高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により糖組成を分析した。高速液体クロマトグラフィーは室温下で実施し、溶出液を東ソー製差屈折計『RI-8012型』でモニタしながら、溶離液として水を0.5ml/分の流速で通液した。結果を表1に示す。

【0036】

【表1】

| 基 質 | 反応物中の糖質 | 組成 (%) |
|-----------|-------------------|--------|
| グルコース | グルコース | 100 |
| マルトース | マルトース | 100 |
| マルトトリオース | グルコース | 9.2 |
| | マルトース | 18.4 |
| | マルトトリオース | 42.2 |
| | α-グルコシルトレハロース | 30.2 |
| マルトテトラオース | グルコース | 6.7 |
| | マルトース | 2.7 |
| | マルトトリオース | 9.0 |
| | マルトテトラオース | 16.2 |
| | α-グルコシルトレハロース | 8.2 |
| | α-マルトシルトレハロース | 57.2 |
| マルトペンタオース | グルコース | 0.7 |
| | マルトテトラオース | 2.0 |
| | マルトペンタオース | 22.9 |
| | α-マルトシルトレハロース | 0.9 |
| | α-マルトトリオシルトレハロース | 73.5 |
| マルトヘキサオース | グルコース | 0.9 |
| | マルトペンタオース | 2.2 |
| | マルトヘキサオース | 28.1 |
| | α-マルトトリオシルトレハロース | 5.6 |
| | α-マルトテトラオシルトレハロース | 68.2 |
| マルトヘプタオース | グルコース | 1.0 |
| | マルトヘキサオース | 1.4 |
| | マルトヘプタオース | 23.4 |
| | α-マルトテトラオシルトレハロース | 4.2 |
| | α-マルトペンタオシルトレハロース | 70.0 |

【0037】表1の結果は、精製酵素がグルコース重合度3以上の還元性澱粉糖であるマルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース及びマルトヘプタオースに作用して、末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質であるα-グルコシル

トレハロース、α-マルトシルトレハロース、α-マルトトリオシルトレハロース、α-マルトテトラオシルトレハロース及びα-マルトペンタオシルトレハロースを生成したことを示している。反応物からはこれら非還元性糖質と未反応の基質に加えて、基質の加水分解物と考

えられるグルコース及び低分子のマルトオリゴ糖が検出され、精製酵素に加水分解作用のあることを示唆していた。個々の基質からの非還元性糖質及び加水分解物の収量は、固形分当たり、マルトトリオースでそれぞれ30.2%及び27.6%で、マルトテトラオースで65.4%及び18.4%、マルトペンタオース乃至マルトヘプタオースで約7.4乃至7.5%及び約2乃至3%であり、グルコース重合度5以上のマルトオリゴ糖からは非還元性糖質が好収率で生成し、加水分解も僅少となる傾向が見られた。なお、グルコース及びマルトースからは新たな糖質の生成を見なかった。

【0038】

【実験例2-2 分子量】ユー・ケー・レムリが『ネイチャー』、第227巻、第680乃至685頁(1970年)に報告している方法に準じて精製酵素をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動したところ、分子量約69,000乃至79,000ダルトンに相当する位置に酵素活性を伴う単一バンドが観察された。なお、このときの分子量マーカーは、ミオシン(200,000ダルトン)、 β -ガラクトシダーゼ(116,250ダルトン)、フォスホリラーゼB(97,400ダルトン)、血清アルブミン(66,200ダルトン)及びオボアルブミン(45,000ダルトン)であった。

【0039】

【実験例2-3 等電点】2%(w/v)アンフォラインを含むポリアクリルアミドゲル上で精製酵素を等電点電気泳動したところ、約5.4乃至6.4に等電点を示した。

【0040】

【実験例2-4 至適温度】常法により、20mM酢酸緩衝液(pH5.5)中、相違する温度で60分間反応させたところ、図1に示すように、精製酵素は75℃付近に至適温度を示した。

【0041】

【実験例2-5 至適pH】常法により、pHの相違するマッキルヴェイン氏緩衝液中、60℃で60分間反応させたところ、図2に示すように、精製酵素はpH5.0乃至5.5付近に至適pHを示した。

【0042】

【実験例2-6 熱安定性】常法により、10mM磷酸緩衝液(pH7.0)中、相違する温度で60分間インキュベートしたところ、図3に示すように、精製酵素は85℃付近まで安定であった。

【0043】

【実験例2-7 pH安定性】常法により、pHの相違するマッキルヴェイン氏緩衝液又は50mM炭酸ナトリウム-炭酸水素ナトリウム緩衝液中、25℃で16時間インキュベートしたところ、図4に示すように、精製酵素はpH4.5乃至9.5付近まで安定であった。

【0044】

【実験例2-8 N末端アミノ酸配列】常法により、パーキン・エルマー製気相プロテイン・シーケンサ『473A型』を使用して分析したところ、精製酵素はN末端に配列表における配列番号3に示すアミノ酸配列を有していた。

【0045】

【実験例2-9 部分アミノ酸配列】精製酵素を適量とり、10mMトリス-塩酸緩衝液(pH9.0)に対して4℃で18時間透析後、10mMトリス-塩酸緩衝液(pH9.0)を加えて酵素濃度約1mg/mlとした。この溶液を約1mlとり、リジルエンドペプチダーゼを10 μ g加え、30℃、48時間インキュベートして酵素を部分加水分解した。加水分解物を予め16%(v/v)水性アセトニトリルを含む0.1%(v/v)トリフルオロ酢酸で平衡化させておいた日本ミリポア・リミテッド製高速液体クロマトグラフィー用カラム『マイクロボンドバックC18』に負荷し、16%(v/v)から48%(v/v)に上昇する水性アセトニトリルの濃度勾配下、カラムに0.1%(v/v)トリフルオロ酢酸を0.9ml/分の流速で通液した。そして、通液開始から約11分後に溶出したペプチド断片を含む画分を採取し、真空乾燥後、50%(v/v)水性アセトニトリルを含む0.1%(v/v)トリフルオロ酢酸に溶解した。以後、実験例2-8と同様に分析したところ、ペプチド断片は配列表における配列番号4に示すアミノ酸配列を有していた。

【0046】以上のような理化学的性質を有する酵素は未だ知られておらず、新規物質であると判断される。

【0047】そこで、本発明者が、配列表における配列番号3及び4に示す部分アミノ酸配列に基づき化学合成したオリゴヌクレオチドをプローブにし、スルフォロブス・アシドカルダリウス(ATCC33909)の染色体DNAを鋭意検索したところ、配列表における配列番号2に示す5'末端からの塩基配列を有する約2,200塩基対からなるDNA断片が得られた。そして、その塩基配列を解説したところ、同微生物が産生する耐熱性酵素は720個のアミノ酸からなる、配列表における配列番号1に示すN末端からのアミノ酸配列を有していることが判明した。

【0048】配列表における配列番号1及び2に示すアミノ酸配列及び塩基配列を解明するに到った一連の工程を要約すると、次のようになる。

(1) 供与体微生物の培養物から耐熱性酵素を分離し、高度に精製後、N末端アミノ酸配列を決定した。一方、その精製酵素プロテアーゼにより部分加水分解し、加水分解物からペプチド断片を単離し、そのアミノ酸配列を決定した。

(2) 別途、供与体微生物の菌体より染色体DNAを分離し、精製後、制限酵素により部分消化し、消化物から約2,000乃至6,000塩基対からなるDNA断

片を採取した。DNAリガーゼにより、このDNA断片を予め制限酵素で切断しておいたプラスミドベクターに連結し、組換えDNAを作製した。

(3) 大腸菌にこの組換えDNAを導入して形質転換体を作製し、前記部分アミノ酸配列に基づき化学合成したオリゴヌクレオチドをプローブとするコロニーハイブリダイゼーションにより当該酵素をコードするDNAを含む形質転換体を選択した。

(4) 形質転換体から組換えDNAを採取し、プライマーとともにアニーリング後、DNAポリメラーゼを作用させてプライマーを伸長し、得られた相補鎖DNAをジオキシ・チェーン・ターミネータ法により分析して塩基配列を決定した。そして、その塩基配列から推定されるアミノ酸配列と前記部分アミノ酸配列を比較し、その塩基配列が当該酵素をコードしていることを確認した。

【0049】次の実験例3及び4では、上記(2)乃至(4)の工程を具体的に説明するが、これら実験例で使用する手法自体は斯界において公知のものであり、例えば、ジェー・サムブルック等『モレキュラー・クローニング・ア・ラボラトリー・マニュアル』、第2版、1989年、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー発行などにも詳述されている。

【0050】

【実験例3 耐熱性酵素をコードするDNAを含む組換えDNAと形質転換体の調製】

【0051】

【実験例3-1 染色体DNAの調製】500ml容フラスコに0.1% (w/v) ポリペプトン、0.1% (w/v) 酵母エキス、0.2% (w/v) 硫酸アンモニウム、0.05% (w/v) 燐酸二水素カリウム、0.02% (w/v) 硫酸マグネシウム七水塩、0.02% (w/v) 塩化カリウム及び水からなる液体培地を約100mlずつとり、120℃で20分間オートクレーブして滅菌し、冷却後、硫酸を加えてpH3.0に調整した。この液体培地にスルフォロブス・アシドカルダリウス(ATCC33909)を接種し、75℃、130rpmで24時間回転振盪培養して種培養液を得た。10l容ファーマンターに上記と同一組成の液体培地を約5lとり、同様に滅菌し、75℃まで冷却し、pH3.0に調整後、上記で得た種培養液を1% (v/v) 接種し、75℃、通気量500ml/分で24時間通気攪拌培養した。

【0052】遠心分離により培養物から採取した菌体をTES緩衝液(pH8.0)に浮遊させ、リゾチームを0.05% (w/v) 加え、37℃で30分間インキュベートした。処理物を-80℃で1時間凍結後、TSS緩衝液(pH9.0)を加えて60℃に加温し、TES緩衝液/フェノール混液を加え、氷冷後、遠心分離により上清を採取した。この上清に2倍容の冷エタノールを加え、沈殿した粗染色体DNAを採取し、SSC緩衝液

(pH7.1)に溶解後、リボヌクレアーゼとプロテアーゼをそれぞれ7.5μg又は125μg加え、37℃で1時間インキュベートして反応させた。反応物にクロロホルム/イソアミルアルコール混液を加えて染色体DNAを抽出し、冷エタノールを加え、生成した染色体DNAを含む沈殿を採取した。このようにして得た精製染色体DNAを濃度約1mg/mlになるようにSSC緩衝液(pH7.1)に溶解し、溶液を-80℃で凍結した。

【0053】

【実験例3-2 組換えDNA pST35と形質転換体ST35の調製】実験例3-1で調製した精製染色体DNA溶液を1mlとり、これに制限酵素Sau3A1を約35単位加え、37℃で20分間反応させて染色体DNAを部分切断した後、蔗糖密度勾配超遠心法により約2,000乃至6,000塩基対からなるDNA断片を採取した。別途、ストラタジーン・クローニング・システムズ製プラスミドベクター『Bluescript II SK(+)]を1μgとり、常法により制限酵素BamHIを作用させて完全に切断した後、上記で得たDNA断片10μgとT4 DNAリガーゼを2単位加え、4℃で一夜静置することによりDNA断片に連結した。得られた組換えDNAにストラタジーン・クローニング・システムズ製コンピテントセル『Epicurian Coli XL1-Blue』を30μl加え、氷冷下で30分間静置後、42℃に加温し、SOCブロスを加え、37℃で1時間インキュベートして組換えDNAを大腸菌に導入した。

【0054】このようにして得た形質転換体を5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル-β-ガラクトシドを50μg/ml含む寒天平板培地(pH7.0)に接種し、37℃で18時間培養後、培地上に形成された約5,000個のコロニーをナイロン膜上に固定した。別途、常法により、配列表における配列番号3に示すアミノ酸配列のAsn-Leu-Trp-Tyr-Phe-Lys-Aspで表わされる配列に基づき5'-AAAYTNTGGTAYTTYAARGA-3'で表わされる塩基配列のプローブ1を化学合成し、同位体³²Pで標識後、前記ナイロン膜上に固定した形質転換体のコロニーにハイブリダイズさせ、顕著な会合を示した15種類の形質転換体を選択した。

【0055】常法により、これら15種類の形質転換体から組換えDNAを採取する一方、配列表における配列番号4に示すアミノ酸配列のGlu-Glu-Trp-His-Ser-Ile-Ileで表わされる配列に基づき5'-GARGARTGGCAYWSNATHAT-3'で表わされる塩基配列のプローブ2を化学合成し、同位体³²Pで標識後、イー・エム・サザン『ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー』、第98巻、第503乃至517頁(1975年)に記載されて

いる方法に準じて上記組換えDNAにハイブリダイズさせ、顕著な会合を示した組換えDNAを採取した。このようにして得た組換えDNA及び形質転換体を、それぞれ、『pST35』、『ST35』と命名した。

【0056】形質転換体ST35をアンピシリン100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含むL-プロス培地(pH7.0)に接種し、37℃で24時間回転振盪培養し、培養終了後、遠心分離により培養物から菌体を採取し、通常のアリカリ法により組換えDNAを菌体外に溶出させた。処理物を常法により精製し、分析したところ、組換えDNA pST35は約6,200塩基対からなり、図5に示すように、当該酵素をコードする約2,200塩基対からなるDNAを制限酵素EcoRVによる切断部位の下流に連結していた。

【0057】

【実験例3-3 形質転換体ST35による組換え型耐熱性酵素の産生】500ml容フラスコに0.1% (w/v) ポリペプトン、0.1% (w/v) 酵母エキス、0.2% (w/v) 硫酸アンモニウム、0.05% (w/v) 燐酸二水素カリウム、0.02% (w/v) 硫酸マグネシウム七水塩、0.02% (w/v) 塩化カリウム及び水からなる液体培地(pH7.0)を約100mlずつとり、120℃で20分間オートクレーブして滅菌し、冷却後、アンピシリンを50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 加えた。この液体培地に実験例3-2で調製した形質転換体ST35を接種し、37℃、130rpmで24時間回転振盪培養して種培養液を得た。次に、10l容ファーマンターに上記と同一組成の液体培地を約5lとり、同様に滅菌し、37℃まで冷却後、アンピシリンを50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 加え、種培養液を1% (v/v) 接種し、37℃、30 通気量500ml/分で24時間通気攪拌培養した。

【0058】培養物を常法により超音波処理して菌体を破碎し、遠心分離により不溶物を除去し、上清に硫酸アンモニウムを70%飽和になるように加え、4℃で24時間静置後、遠心分離により沈澱部を採取した。この沈澱を少量の10mM燐酸緩衝液(pH8.5)に溶解し、新鮮な同一緩衝液に対して10時間透析後、酵素活性を測定したところ、培養物1l当たり約8.0単位の組換え型耐熱性酵素が検出された。

【0059】対照として、大腸菌XLI-Blue株又はスルフォロブス・アシドカルダリウス(ATCC33909)をアンピシリン無含有の上記と同一組成の液体培地を使用し、スルフォロブス・アシドカルダリウス(ATCC33909)の場合、始発pH及び培養温度をそれぞれ3.0及び75℃に設定した以外は前記と同様に培養・処理した。処理物の酵素活性を測定したところ、スルフォロブス・アシドカルダリウス(ATCC33909)により耐熱性酵素の産生は培養物1l当たり約1.8単位と、形質転換体ST35と比較して有意に低いものであった。なお、宿主に使用した大腸菌XLI

-Blue株は耐熱性酵素を全く産生しなかった。

【0060】その後、形質転換体ST35が産生した組換え型耐熱性酵素を実験例1乃至2の方法により精製し、その性質・性状を調べたところ、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分子量約69,000乃至79,000ダルトンと等電点電気泳動で約5.4乃至6.4に等電点を示すとともに、水溶液(pH7.0)中、85℃で60分間インキュベートしても実質的に失活しないなど、供与体微生物であるスルフォロブス・アシドカルダリウス(ATCC33909)が産生する耐熱性酵素とほぼ同じ理化学的性質を有していた。このことは、組換えDNA技術によっても耐熱性酵素を製造でき、且つ、その生産性も有意に向上することを示唆している。

【0061】

【実験例4 相補鎖DNAの調製並びにその塩基配列及びアミノ酸配列の決定】実験例3-2で調製した組換えDNA pST35を2 μg とり、これに2M水酸化ナトリウム水溶液を加えて変性させた後、適量の冷エタノールを加え、生成したテンプレートDNAを含む沈澱を採取し、真空乾燥した。このテンプレートDNAに化学合成した5'-GTAAACGACGGCCAGT-3'で表わされる塩基配列のプライマーを50 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ と、20mM塩化マグネシウムと塩化ナトリウムを含む40mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)を10 μl 加え、65℃で2分間インキュベートしてアニーリングした後、dATP、dGTP及びdTTPをそれぞれ7.5 μM 含む水溶液を2 μl と、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP (2mCi/ml)を0.5 μl と、0.1Mジチオスレイトールを1 μl と、1.5単位/mlのT7 DNAポリメラーゼを2 μl 加え、25℃で5分間インキュベートすることによりプライマーを5'末端から3'末端に向かって伸長させ、相補鎖DNAを生成させた。

【0062】次に、上記で得た相補鎖DNAを含む反応物を四等分し、それぞれにddATP、ddCTP、ddGTP及びddTTPのいずれかを8 μM と80 μM dNTPを含む50mM塩化ナトリウム水溶液を2.5 μl 加え、37℃で5分間インキュベートして反応させた後、20mM EDTA、0.05% (w/v) ブロムフェノールブルー及び0.05% (w/v) キシレンシアノールを含む98% (v/v) 水性ホルムアミド溶液を4 μl 加えて反応を停止させた。反応物を沸騰水中で3分間加熱後、6% (w/v) ポリアクリルアミドゲル上にとり、約2,000Vの定電圧を印加しながら電気泳動してDNA断片を分離し、次いで、常法によりゲルを固定し、乾燥させた後、オートラジオグラフィした。

【0063】ラジオグラム上に分離したDNA断片を分析した結果、相補鎖DNAは配列表における配列番号5

に示す約 2, 200 塩基対からなる塩基配列を含んでいることが判明した。この塩基配列から推定されるアミノ酸配列はその配列番号 5 に併記したとおりであり、このアミノ酸配列と配列表における配列番号 3 及び 4 に示す部分アミノ酸配列を比較したところ、配列番号 3 の配列は配列番号 5 における第 1 乃至 30 番目の配列に、また、配列番号 4 の配列は配列番号 5 における第 468 乃至 478 番目の配列に一致した。これは、この発明の組換え型耐熱性酵素が配列表における配列番号 1 に示す N 末端からのアミノ酸配列を有することあり、スルフォロ

【0064】以上説明したように、グルコース重合度 3 以上の還元性澱粉糖から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する耐熱性酵素は、本発明者の長年に亘る研究の一成果として見出されたものであり、従来公知の酵素には見られない独特の理化学的性質を具備している。この発明は、組換え DNA 技術を応用することにより、この耐熱性酵素を創製しようというものである。以下、実施例等を参照しながら、この発明の組換え型耐熱性酵素並びにその製造方法及び用途につき、具体的に説明する。

【0065】この発明でいう組換え型耐熱性酵素とは、組換え DNA 技術により創製され、グルコース重合度 3 以上の還元性澱粉糖から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する耐熱性酵素全般を意味する。この発明の組換え型耐熱性酵素は、通常、解明されたアミノ酸配列を有しており、その一例として、例えば、配列表における配列番号 1 に示す N 末端からのアミノ酸配列又はそれに相同的なアミノ酸配列が挙げられる。配列番号 1 に示すアミノ酸配列に相同的なアミノ酸配列を有する変異体は、所期の理化学的性質を実質的に変えることなく、配列番号 1 のアミノ酸配列における構成アミノ酸の 1 個又は 2 個以上を他のアミノ酸で置換することにより得ることができる。なお、同じ DNA であっても、それを導入する宿主や、その DNA を含む形質転換体の培養に使用する栄養培地の成分・組成や培養温度・pH などによって、宿主内酵素による DNA 発現後の修飾などにより、所期の理化学的性質は保持しているものの、配列番号 1 に示すアミノ酸配列における N 末端付近のアミノ酸が 1 個又は 2 個以上欠失したり、N 末端に 1 個又は 2 個以上のアミノ酸が新たに付加した変異体の產生することがある。斯かる変異体であっても、それが所期の理化学的性質を具備しているかぎり、当然、この発明の組換え型耐熱性酵素に包含される。

【0066】この発明による組換え型耐熱性酵素は、特定の DNA を含む形質転換体の培養物から採取することができる。この発明で使用する形質転換体は、例えば、

配列表における配列番号 2 に示す 5' 末端からの塩基配列若しくはそれに相同的な塩基配列又はそれらに相補的な塩基配列の DNA を適宜宿主に導入することにより得ることができる。なお、上記塩基配列は、遺伝子コードの縮重を利用して、コードするアミノ酸配列を変えることなく、塩基の 1 個又は 2 個以上を他の塩基に置き換えてもよい。また、DNA が宿主中で実際に当該酵素の産生を発現するために、当該酵素又はその相同変異体をコードする塩基配列における塩基の 1 個又は 2 個以上を他の塩基で適宜置換し得ることは言うまでもない。

【0067】この発明で使用する DNA は、それが前述のような配列を有するかぎり、それが天然に由来するものか人為的に合成されたものであるかは問わない。天然の給源としては、例えば、スルフォロブス・アシドカルダリウス (ATCC 33909) を含むスルフォロブス属の微生物が挙げられる。これら微生物の菌体からはこの発明の DNA を含む遺伝子が得られる。すなわち、斯かる微生物を栄養培地に接種し、好気的条件下で約 1 日乃至 3 日間培養後、培養物から菌体を採取し、リゾチームや β -グルカナーゼなどの細胞壁溶解酵素や超音波で処理することにより当該 DNA を含む遺伝子を菌体外に溶出させる。このとき、細胞壁溶解酵素にプロテアーゼなどの蛋白質加水分解酵素を併用したり、菌体を超音波処理する際、SDS などの界面活性剤を共存させたり凍結融解してもよい。斯くして得られる処理物に、例えば、フェノール抽出、アルコール沈殿、遠心分離、プロテアーゼ処理、リボヌクレアーゼ処理などの斯界における通常一般の方法を適用すれば目的の DNA が得られる。一方、DNA を人為的に合成するには、例えば、配列表における配列番号 2 に示す塩基配列に基づいて化学合成するか、配列表における配列番号 1 に示すアミノ酸配列をコードする DNA を自律複製可能な適宜ベクターに挿入して組換え DNA とし、これを適宜宿主に導入して得られる形質転換体を培養し、培養物から菌体を採取し、その菌体から当該 DNA を含むプラスミドを採取すればよい。

【0068】斯かる DNA は、通常、組換え DNA の形態で宿主に導入される。組換え DNA は、通常、DNA と自律複製可能なベクターを含んでなり、DNA が入手できれば、通常一般の組換え DNA 技術により比較的容易に調製することができる。斯かるベクターの例としては、pBR322、pUC18、Bluescript II SK (+)、pKK223-3、pUB110、pTZ4、pC194、pHV14、TRp7、YEp7、pBS7 などのプラスミドベクターや λ gt \cdot λ C、 λ gt \cdot λ B、 ρ 11、 ϕ 1、 ϕ 105 などのファージベクターが挙げられる。このうち、この発明の DNA を大腸菌で発現させるには pBR322、pUC18、Bluescript II SK (+)、pKK223-3、 λ gt \cdot λ C 及び λ gt \cdot λ B が好適であ

り、一方、枯草菌で発現させるには pUB110、pTZ4、pC194、 ρ 11、 ϕ 1 及び ϕ 105 が好適である。pHV14、TRp7、YEp7 及び pBS7 は、組換え DNA を二種以上の宿主内で複製させる場合に有用である。

【0069】DNA を斯かるベクターに挿入するには、斯界において通常一般の方法が採用される。具体的には、まず、DNA を含む遺伝子と自律複製可能なベクターとを制限酵素及び／又は超音波により切断し、次に、生成した DNA 断片とベクター断片とを連結する。遺伝子及びベクターの切断にヌクレオチドに特異的に作用する制限酵素、とりわけ、II 型の制限酵素、詳細には、Sau 3AI、EcoRI、Hind III、Bam HI、Sal I、Xba I、Sac I、Pst I、Ban III、Spe I などを使用すれば、DNA 断片とベクター断片を連結するのが容易となる。DNA 断片とベクター断片を連結するには、必要に応じて、両者をアニーリングした後、生体内又は生体外で DNA リガーゼを作用させればよい。斯くして得られる組換え DNA は、適宜宿主に導入して形質転換体とし、これを培養することにより無限に複製可能である。

【0070】このようにして得られる組換え DNA は、大腸菌、枯草菌、放線菌、酵母を始めとする適宜の宿主微生物に導入することができる。宿主が大腸菌の場合には、宿主を組換え DNA とカルシウムイオンの存在下で培養すればよく、一方、宿主が枯草菌の場合には、コンピテントセル法やプロトプラスト法を適用すればよい。形質転換体をクローニングするには、コロニーハイブリダイゼーション法を適用するか、グルコース重合度 3 以上の還元性澱粉糖を含む栄養培地で培養し、該澱粉糖より末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成するものを選択すればよい。

【0071】斯くして得られる形質転換体は、栄養培地で培養すると、菌体内外に当該酵素を産生する。栄養培地には、通常、炭素源、窒素源、ミネラル、さらには、必要に応じて、アミノ酸やビタミンなどの微量栄養素を補足した通常一般の液体培地が使用され、個々の炭素源としては、例えば、澱粉、澱粉加水分解物、グルコース、果糖、蔗糖、トレハロースなどの糖源が、また、窒素源としては、例えば、アンモニア乃至アンモニア塩、尿素、硝酸塩、ペプトン、酵母エキス、脱脂大豆、コーンステーパーリカー、肉エキスなどの含窒素無機乃至有機物が挙げられる。形質転換体を斯かる栄養培地に接種し、栄養培地を温度 20 乃至 65℃、pH 2 乃至 9 に保ちつつ、通気攪拌などによる好気的条件下で約 1 乃至 6 日間培養すれば、当該酵素を含む培養物が得られる。この培養物は酵素剤としてそのまま使用可能ではあるが、通常は使用に先立ち、必要に応じて、超音波や細胞溶解酵素により菌体を破碎した後、濾過、遠心分離などにより酵素を菌体又は菌体破碎物から分離し、精製する。精

製には酵素を精製するための通常の方法が採用でき、例えば、菌体又は菌体破碎物を除去した培養物に濃縮、塩析、透析、分別沈殿、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル電気泳動、等電点電気泳動などの 1 種又は 2 種以上を適宜組合わせて適用すればよい。

【0072】前述のとおり、この発明による組換え型耐熱性酵素は、55℃を越える温度で反応させても、実質的に失活することなく、グルコース重合度 3 以上の還元性澱粉糖から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成するという、従来の酵素には見られない独特の性質を有する。生成した非還元性糖質は温和で上品な甘味に加えて適度の粘度と保湿性を有し、そして、何よりも、分子中に還元性基を有しないので、着色や変質の懸念なく飲食物を甘味付けできるという大きな利点がある。当該酵素のこの性質を利用することにより、従来、還元性故に敬遠されがちであった種々の澱粉糖を、還元性を有しないか還元性が顕著に低下した、扱い易い、有用な糖質に変換できることとなる。

【0073】斯かる変換方法につきさらに説明すると、この発明による組換え型耐熱性酵素の基質には、通常、澱粉、アミロペクチン、アミロースなどの澱粉又は澱粉質を酸及び／又はアミラーゼによって部分的に加水分解して得られる還元性澱粉糖が用いられる。斯かる澱粉糖は斯界における通常一般の方法により得ることができ、通常、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース、マルトヘプタオースなどのグルコース重合度 3 以上のマルトオリゴ糖の 1 種又は 2 種以上を含んでなる。アミラーゼ研究会編『ハンドブック・オブ・アミレーシズ・アンド・リレイテッド・エンザイムズ』、1988 年、バーガモン・プレス発行に記載されている α -アミラーゼ、マルトテトラオース生成アミラーゼ、マルトペンタオース生成アミラーゼ及びマルトヘキサオース生成アミラーゼは、この発明で使用する還元性澱粉糖の調製に特に有用であり、これらアミラーゼのいずれかを使用することにより、グルコース重合度 3 以上の還元性澱粉糖を豊富に含む澱粉糖混合物が容易に且つ効率的に得られる。なお、このとき、必要に応じて、プルランナーゼやイソアミラーゼなどの澱粉枝切酵素を併用すれば、当該酵素の基質となり得る還元性澱粉糖の収量を上げることができる。

【0074】この発明による酵素的変換方法においては、通常、基質として上記したような還元性澱粉糖の 1 種又は 2 種以上を含む水溶液にこの発明による組換え型耐熱性酵素を共存せしめ、水溶液を所定の温度、pH に保ちつつ、所望量の非還元性糖質が生成するまで反応させる。反応は 0.1% (w/w) 程度の基質濃度下でも進行するが、この発明による変換方法を大規模に実施する場合には、より高濃度の 2% (w/w) 以上、望まし

くは、5乃至50% (w/w) とするのがよい。反応時の温度とpHは組換え型耐熱性酵素が失活することなく基質に効率的に作用するレベルに設定され、温度は55℃を越え、85℃を越えないレベルに、望ましくは、約56乃至70℃に、また、pHは4乃至7、望ましくは、約5乃至6の範囲に設定される。組換え型耐熱性酵素の量と反応時間は、反応の進行具合に依って適宜に設定する。斯くして、グルコース重合度3以上の還元性澱粉糖は末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質に変換され、マルトペンタオースの場合、変換率は約74%にも達する。

【0075】この発明の変換方法により得られた反応物はそのまま使用可能ではあるが、通常、使用に先立ち精製する。すなわち、濾過、遠心分離などにより反応物から不溶物を除去し、活性炭により脱色した後、イオン交換樹脂により脱塩・精製し、濃縮してシロップ状物とする。用途に依っては、このシロップ状物を真空乾燥、噴霧乾燥などにより固状物としてもよい。実質的に非還元性糖質のみからなる製品を得るには、上記シロップ状物にイオン交換樹脂、活性炭、シリカゲルなどによる糖質を分離するための種々のクロマトグラフィー、アルコール、アセトンなどによる分別沈澱、膜濾過、酵母による発酵、アルカリによる還元性糖質の分解除去などの1種又は2種以上を適用する。大量に反応物を処理するには、例えば、特開昭58-23799号公報や特開昭58-72598号公報に開示されている強酸性カチオン交換樹脂を使用する固定床方式、移動床方式又は疑似移動床方式のイオン交換クロマトグラフィーが有用であり、これらの方法によるときには、非還元性糖質の含量が高い製品を大量且つ効率的に得ることができる。

【0076】斯くして得られる非還元性糖質は、糖質甘味剤の還元性を嫌う種々の物品に広範な用途を有し、例えば、飲食物、化粧品、医薬品を始めとする組成物一般の甘味剤、呈味改善剤、品質改善剤、安定剤、賦形剤などとして極めて有用である。加えて、斯かる非還元性糖質は、グルコアミラーゼ、 α -グルコシダーゼ、あるいは、特願平6-79291号明細書に開示されているトレハロース遊離酵素を作用させると、ほぼ定量的にトレハロースを与えることから、従来、大量に入手が難しかったトレハロースを製造するための中間体としても有用である。

【0077】以下、2~3の実施例により、この発明による組換え型耐熱性酵素の製造方法とその組換え型耐熱性酵素による還元性澱粉糖の酵素的変換方法を具体的に説明する。

【0078】

【実施例A-1 組換え型耐熱性酵素の製造】500ml容フラスコに1% (w/v) ポリペプトン、0.5% (w/v) 酵母エキス、0.5% (w/v) 塩化ナトリウム及び水からなる液体培地 (pH7.0) を約100

mlずつとり、120℃で20分間オートクレーブして滅菌し、冷却後、アンピシリンを50 μ g/ml加えた。この液体培地に実験例3-2の方法で得た形質転換体ST35を接種し、37℃、130rpmで24時間回転振盪培養して種培養液を得た。次に、30l容フーマンターに上記と同一組成の液体培地を約18lとり、同様に滅菌し、37℃まで冷却後、アンピシリンを50 μ g/ml加え、種培養液を1% (v/v) 接種し、37℃で24時間通気攪拌培養した。

【0079】培養物を超音波処理して菌体を破碎し、遠心分離により不溶物を除去後、上清中の酵素活性を測定したところ、培養物1l当たり、約75単位の組換え型耐熱性酵素が産生していた。この上清を実験例1の方法により精製したところ、比活性約80単位/mg蛋白質の組換え型耐熱性酵素を1ml当たり約57単位含む水溶液が約10ml得られた。

【0080】

【実施例A-2 組換え型耐熱性酵素の製造】

【0081】

【実施例A-2 (a) 形質転換体の作製】常法により化学合成した5'-GATCCGTTCTGGCAAA TATTCTGAAATGAGCTGT-3'、5'-TGACAATTAATCATCGGCTCGTCTA ATGTGTGGAATTCTGATTCTGA-3'、5'-ATTTTTTAATAAAATCAGGAGG AAAAAATATGATATCAGCAACCTAC A-3'、5'-GATTACAGTTAAATAAG AATTTTAATTTTGGTGACGTAATCG ATGAA-3'、5'-TTCACCTAGTTAGA ATGTGATGAAGGCTGCGGCCGCTG CAGAGCTCA-3'、5'-CGATGATTA ATTGTCAACAGCTCATTTTCAGAATA TTTGCCAGAAGC-3'、5'-TTTTAT TAAAAAATTCTGAATCAGAATTCCAC ACATTAGACGAGC-3'、5'-TTAAC TGTAATCTGTAGGTTGCTGATATCA TATTTTTTCTCCTCTGA-3'、5'-TAGTGAATTCTACGATTACGTCACCAA AATTAAAATTCTTAT-3'及び5'-AGCTTGAGCTCTGCAGCGGCCGCGAGGC CTTTCATCACATTCTAAC-3'で表わされる塩基配列を有する10種類のオリゴヌクレオチドを適量混合し、100℃、65℃、37℃及び20℃でそれぞれ20分間インキュベートしてアニールさせた。得られた下記の下記1に示す塩基配列の二本鎖DNAに予め制限酵素Bam HI及びHind IIIで切断しておいたファルマシア製プラスミドベクター『pKK223-3』を加え、T4 DNAリガーゼの存在下、4℃で一晩静置して連結させることにより、配列表の配列番号2に示す塩基配列における第1乃至59番目及び第2、

149乃至2, 160番目の塩基配列を含む第一の組換えDNAを得た。なお、この第一の組換えDNAにおいては、配列表の配列番号2に示す塩基配列における第一

番目のグアニンがアデニンに置換されていた。

【0082】

【化1】

5'-GATCCGTTCT GGCAATATT CTGAATGAG CTGTTGACAA TTAATCATCG GCTCGTCTAA 60
3'- GCAAGA CCGTTTATTA GACTTTACTC GACAACTGTT AATTAGTAGC CGAGCAGATT 56

TGTGTGGAAT TCTGATTCTGA ATTTTITTAAT AAAATCAGGA GGAAAAATA TGATATCAGC 120
ACACACCTTA AGACTAACGT TAAAAAATTA TTTTAGTCCT CTTTTTTTAT ACTATAGTCG 116

AACCTACAGA TTACAGTTAA ATAAGAATTT TAATTTTGGT GACGTAATCG ATGAATTCAC 180
TTGGATGTCT AATGTCAATT TATTCITAAA ATTAAACCA CTGCATTAGC TACITTAAGTG 176

TAGTTAGAAT GTGATGAAGG CCTGCGGCCG CTGCAGAGCT CA -3' 222
ATCAATCTTA CACTACTTCC GGACGCCGGC GACGTCTCGA GTTCGA-5' 222

【0083】別途、実験例3-2の方法により得た組換えDNA pST35を制限酵素Ban I I I及びSpe Iで切断し、配列表の配列番号2に示す塩基配列における第60乃至2, 148番目までの配列を含む約2, 090塩基対のDNA断片を得た。このDNA断片に予め制限酵素Ban I I I及びSpe Iで切断し、20

型耐熱性酵素を1ml当たり約230単位含む水溶液が約4, 040ml得られた。

【0086】実験例2の方法によりこの精製酵素の性質・性状を調べたところ、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分子量約69, 000乃至79, 000ダルトンと等電点電気泳動で約5.4乃至6.4に等電点を示すとともに、水溶液(pH7.0)中、85℃で60分間インキュベートしても実質的に失活しないなど、供与体微生物であるスルフォロブス・アシドカルダリウス(ATCC33909)が産生する耐熱性酵素とほぼ同じ理化学的性質を有していた。

【0087】

【0084】この組換えDNA pST36を実験例3-2の方法に準じて宝酒造製コンピテントセル『BMH71-18』に導入し、この発明による組換え型耐熱性酵素をコードするDNAを含む形質転換体ST36を得た。実験例3-2の方法により形質転換体ST36を培養し、培養物から菌体を採取し、溶出させた組換えDNAを精製し、分析したところ、組換えDNA pST36は約6, 700塩基対からなり、図6に示すように、当該酵素をコードする約2, 160塩基対からなるDNAを制限酵素EcoRVによる切断部位の下流に連結していた。

【0085】

【実施例A-2(b) 形質転換体による組換え型耐熱性酵素の製造】形質転換体ST36を2%(w/v)マルトース、4%(w/v)『N-Z-Soyペプトン』(シグマ製)、2%(w/v)酵母エキス、0.5%(w/v)磷酸二水素ナトリウム、200μg/mlアンピシリン及び水からなる液体培地(pH7.0)を用いた以外は実施例A-1と同様にして培養した。培養物を超音波処理して菌体を破碎し、遠心分離により不溶物を除去後、上清中の酵素活性を測定したところ、培養物1l当たり、約120, 000単位の組換え型耐熱性酵素が産生していた。この上清を実験例1の方法により精製したところ、比活性約80単位/mg蛋白質の組換え

【実施例B-1 非還元性糖質を含むシロップ状物への変換】濃度6%(w/w)の馬鈴薯澱粉乳を加熱して糊化した後、pH4.5、温度50℃に調整し、林原生物化学研究所製イソアミラーゼ剤を澱粉固形分1g当たり2, 500単位加え、20時間反応させた。反応物をpH6.5に調整し、120℃で10分間オートクレーブして酵素を失活させた後、40℃まで冷却し、ノボ・ノルディスク・インダストリー製α-アミラーゼ剤『ターマミール60L』を澱粉固形分1g当たり150単位加え、20時間反応させた。新たに得られた反応物を120℃で20分間オートクレーブして酵素を失活させた後、60℃まで冷却し、pH5.5に調整後、実施例A-1の方法で得た組換え型耐熱性酵素を澱粉固形分1g当たり1単位加え、96時間反応させた。反応物を97℃で30分間加熱して酵素を失活させ、冷却し、濾過後、常法により活性炭で脱色し、イオン交換樹脂により脱塩・精製し、濃縮して濃度約70%(w/w)のシロップ状物を原料澱粉固形分当たり約90%の収率で得た。

【0088】DEが24.5と低く、非還元性糖質としてα-グルコシルトレハロース、α-マルトシルトレハロース、α-マルトトリオシルトレハロース、α-マルトテトラオシルトレハロース及びα-マルトペンタオシルトレハロースを固形分当たりそれぞれ12.1%、

5. 4 %、30. 0 %、1. 4 %又は2. 0 %含む本品は、温和で上品な甘味に加えて適度の粘度と保湿性を有しており、甘味剤、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして飲食物、化粧品、医薬品を始めとする組成物一般に有利に配合使用できる。

【0089】

【実施例B-2 非還元性糖質を含む粉状物への変換】
実施例B-1の方法で得たシロップ状物における非還元性糖質の含量を高めるべく、強酸性カチオン交換樹脂によるカラム分画を適用した。すなわち、架橋度4%の東京有機化学工業製ナトリウム型強酸性カチオン交換樹脂『XT-1016』を水中に懸濁させ、内径5. 4 cm、長さ5mのジャケット付ステンレス製円筒管4本に均一に充填後、円筒管を直列に連結してカラムの全長を20mとした。カラム温度を55℃に保ちつつ、水で適宜希釈したシロップ状物をカラムに対して約5% (v/v) 負荷し、カラムに55℃の温水をSV0. 13で通液した。そして、溶出液から非還元性糖質の含量が高い画分を採取し、常法により精製し、濃縮し、真空乾燥し、粉碎して、非還元性糖質含量の高い粉状物を原料固10
形分当たり約64%の収率で得た。

【0090】DEが4. 8と低く、非還元性糖質としてα-グルコシルトレハロース、α-マルトシルトレハロース、α-マルトリオシルトレハロース、α-マルトテトラオシルトレハロース及びα-マルトペンタオシルトレハロースを固形分当たり12. 8%、11. 5%、46. 6%、2. 3%又は3. 4%含む本品は、実施例B-1のシロップ状物と同様、温和で上品な甘味を有しており、甘味剤、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして飲食物、化粧品、医薬品を始めとする組成物一般に有利に配合使用できる。20

【0091】

【実施例B-3 非還元性糖質を含むシロップ状物への変換】濃度33% (w/w) のとうもろこし澱粉乳に最終濃度0. 1% (w/w) となるように炭酸カルシウムを加え、pH6. 5に調整後、ターマミール60Lを澱粉固形分当たり0. 2% (w/w) 加え、95℃で15分間反応させた。反応物を120℃で10分間オートクレーブして酵素を失活させ、55℃に冷却後、林原生物化学研究所製シュドモナス・スツッチェリ由来のマルトテオラオース生成アミラーゼ剤を澱粉固形分1g当たり5単位加えて6時間反応させた。反応物に上田化学製α-アミラーゼ剤『α-アミラーゼ2A』を澱粉固形分1g当たり30単位加え、65℃でさらに4時間反応させた後、120℃で10分間オートクレーブして酵素を失活させ、65℃まで冷却し、pH5. 5に調整し、実施例A-1の方法で得た組換え型耐熱性酵素を澱粉固形分1g当たり2単位加え、48時間反応させた。反応物を97℃で30分間加熱して酵素を失活させ、冷却し、濾過後、常法により活性炭で脱色し、イオン交換樹脂で40

脱塩・精製し、濃縮して濃度約70% (w/w) のシロップ状物を原料澱粉固形分当たり約90%の収率で得た。

【0092】DEが17. 1と低く、非還元性糖質としてα-グルコシルトレハロース、α-マルトシルトレハロース、α-マルトリオシルトレハロース、α-マルトテトラオシルトレハロース及びα-マルトペンタオシルトレハロースを固形分当たりそれぞれ8. 9%、29. 3%、0. 8%、0. 7%又は0. 7%含む本品は、温和で上品な甘味に加えて適度の粘度と保湿性を有しており、甘味剤、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして飲食物、化粧品、医薬品を始めとする組成物一般に有利に配合使用できる。

【0093】

【実施例B-4 非還元性糖質を含む粉状物への変換】林原生物化学研究所製高純度マルトペンタオースの20% (w/w) 水溶液に実施例A-1の方法で得た組換え型耐熱性酵素をマルトペンタオース1g当たり1. 0単位加え、70℃で48時間反応させた。マルトペンタオースの約72%がα-マルトリオシルトレハロースに変換された反応物を97℃で30分間加熱して酵素を失活させ、冷却し、濾過後、常法により活性炭で脱色し、イオン交換樹脂により脱塩・精製し、濃縮した。

【0094】その後、濃縮物に実施例B-2のカラム分画を適用し、α-マルトリオシルトレハロース含量の高い画分を採取し、常法により精製し、濃縮し、噴霧乾燥して非還元性糖質含量の高い粉状物を原料固形分当たり約26%の収率で得た。

【0095】DEが0. 2未満と極めて低く、非還元性糖質としてα-マルトリオシルトレハロースを固形分当たり99. 0%含む低甘味の本品は、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして飲食物、化粧品、医薬品を始めとする組成物一般に有利に配合使用できる。

【0096】

【実施例B-5 結晶性トレハロースを含む粉状物への変換】松谷化学工業製還元性澱粉糖『パインデックス#4』40重量部を水60重量部に加熱溶解し、溶液を65℃、pH5. 5に調整後、実施例A-1の方法で得た組換え型耐熱性酵素を澱粉糖固形分1g当たり1単位加え、96時間反応させた。反応物を97℃で30分間加熱して酵素を失活させ、濃度約20% (w/w) まで希釈後、ナガセ生化学工業グルコアミラーゼ剤『グルコチーム』を澱粉糖固形分1g当たり10単位加えて40時間反応させた。その後、反応物を加熱して酵素を失活させ、冷却し、濾過後、常法により活性炭で脱色し、イオン交換樹脂により脱塩・精製し、濃度約60% (w/w) まで濃縮した。このようにして得られた固形分当たりトレハロースを30. 1% (w/w) 含む濃縮物を分画用イオン交換樹脂としてオルガノ製ナトリウム型強酸

性カチオン交換樹脂『CG6000』を使用した以外は実施例 B-2 と同様にしてカラム分画することにより、固形分当たりトレハロースを約 97% (w/w) 含む画分を採取した。

【0097】この画分を約 75% (w/w) まで濃縮し、助晶缶にとり、攪拌しながら徐冷して得た晶出率約 45% のマスキットを、約 85℃ の温風を噴霧乾燥塔上部から下方に向かって送風しつつ、噴霧乾燥塔の上部に設けたノズルより約 150 kg/cm² 加圧下で噴霧乾燥塔の下方に向かって噴霧する一方、噴霧乾燥塔底部に設けた金網コンベア上に捕集した結晶性粉末を、コンベア下部より約 45℃ の温風を送風しつつ、噴霧乾燥塔外に徐々に搬出した。その後、結晶性粉末を熟成塔に充填し、温風気流中で 10 時間熟成し、結晶化と乾燥を完了した。このようにして、トレハロース含水結晶の粉状物を原料固形分当たり約 90% の収率で得た。

【0098】実質的に吸湿性を示さず、取扱いも容易な本品は、甘味剤、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして飲食物、化粧品、医薬品を始めとする組成物一般に有利に配合使用できる。

【0099】

【実施例 B-6 非還元性糖質を含むシロップ状物への変換】林原生物化学研究所製高純度マルトテトラオースを 40% (w/w) 水溶液とし、実施例 A-2 の方法により得た組換え型耐熱性酵素をマルトテトラオース固形分 1 g 当たり 2.0 単位加え、60℃ で 72 時間反応させて固形分当たり α-マルトシルトレハロース及び α-グルコシルトレハロースをそれぞれ約 57% 及び約 9% 含む反応物を得た。この反応物を 97℃ で 30 分間加熱して酵素を失活させ、冷却し、常法にしたがって濾過し、活性炭により脱色し、イオン交換樹脂により脱塩・精製した後、濃縮した。

【0100】その後、濃縮物に実施例 B-2 のカラム分画を適用し、得られた α-マルトシルトレハロース含量の高い画分を採取し、常法にしたがって精製し、濃縮して濃度約 70% (w/w) のシロップ状物を原料マルトテトラオース固形分当たり約 90% の収率で得た。

配列

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Ile | Ser | Ala | Thr | Tyr | Arg | Leu | Gln | Leu | Asn | Lys | Asn | Phe | Asn | Phe | Gly |
| 1 | | | | 5 | | | | 10 | | | | | | 15 | | |
| Asp | Val | Ile | Asp | Asn | Leu | Trp | Tyr | Phe | Lys | Asp | Leu | Gly | Val | Ser | His | Leu |
| | | | 20 | | | | 25 | | | | | 30 | | | | |
| Tyr | Leu | Ser | Pro | Val | Leu | Met | Ala | Ser | Pro | Gly | Ser | Asn | His | Gly | Tyr | Asp |
| 35 | | | | 40 | | | | | 45 | | | | | 50 | | |
| Val | Ile | Asp | His | Ser | Arg | Ile | Asn | Asp | Glu | Leu | Gly | Gly | Glu | Lys | Glu | Tyr |
| | | | 55 | | | | 60 | | | | | 65 | | | | |
| Arg | Arg | Leu | Ile | Glu | Thr | Ala | His | Thr | Ile | Gly | Leu | Gly | Ile | Ile | Gln | Asp |
| | | 70 | | | | 75 | | | | | 80 | | | | 85 | |
| Ile | Val | Pro | Asn | His | Met | Ala | Val | Asn | Ser | Leu | Asn | Trp | Arg | Leu | Met | Asp |
| | | | 90 | | | | | 95 | | | | | | 100 | | |

【0101】DE が 3.7 と低く、非還元性糖質として α-マルトシルトレハロース及び α-グルコシルトレハロースを固形分当たりそれぞれ 84% 及び 4.0% 含む本品は、温和で上品な甘味に加えて適度の粘性と保湿性を有しており、甘味材、呈味改善剤、品質改善剤、安定剤、賦形剤などとして飲食物、化粧品、医薬品を始めとする組成物一般に有利に配合使用できる。

【0102】

【発明の効果】以上説明したように、この発明は、グルコース重合度 3 以上の還元性澱粉糖から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する新規な耐熱性酵素の発見に基づくものである。この発明は、組換え DNA 技術により、この耐熱性酵素を大規模且つ効率的に生産する道を拓くものである。この発明の組換え型耐熱性酵素を使用する変換方法によるときは、雑菌汚染を懸念することなく、グルコース重合度 3 以上の還元性澱粉糖を末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質に効率的に変換することができる。この発明の酵素的変換方法により得られる非還元性糖質は温和で上品な甘味を有し、そして、何よりも、分子中に還元性基を有しないので、着色や変質の懸念なく飲食物、化粧品、医薬品を始めとする組成物一般に有利に配合使用できる実益がある。しかも、この発明の組換え型耐熱性酵素はアミノ酸配列まで明らかにされた酵素であり、飲食物や医薬品への配合使用を前提とするトレハロースや末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質の製造に安心して使用し得るものである。

【0103】この発明は斯くも顕著な作用効果を奏する意義のある発明であり、斯界に貢献すること誠に多大な発明であると言える。

【0104】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：720

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

29 Val Leu Lys Met Gly Lys Lys Ser Lys Tyr Tyr Thr Tyr Phe Asp Phe Phe
 105 110 115
 Pro Glu Asp Asp Lys Ile Arg Leu Pro Ile Leu Gly Glu Asp Leu Asp Thr
 120 125 130 135
 Val Ile Ser Lys Gly Leu Leu Lys Ile Val Lys Asp Gly Asp Glu Tyr Phe
 140 145 150
 Leu Glu Tyr Phe Lys Trp Lys Leu Pro Leu Thr Glu Val Gly Asn Asp Ile
 155 160 165 170
 Tyr Asp Thr Leu Gln Lys Gln Asn Tyr Thr Leu Met Ser Trp Lys Asn Pro
 175 180 185
 Pro Ser Tyr Arg Arg Phe Phe Asp Val Asn Thr Leu Ile Gly Val Asn Val
 190 195 200
 Glu Lys Asp His Val Phe Gln Glu Ser His Ser Lys Ile Leu Asp Leu Asp
 205 210 215 220
 Val Asp Gly Tyr Arg Ile Asp His Ile Asp Gly Leu Tyr Asp Pro Glu Lys
 225 230 235
 Tyr Ile Asn Asp Leu Arg Ser Ile Ile Lys Asn Lys Ile Ile Ile Val Glu
 240 245 250 255
 Lys Ile Leu Gly Phe Gln Glu Glu Leu Lys Leu Asn Ser Asp Gly Thr Thr
 260 265 270
 Gly Tyr Asp Phe Leu Asn Tyr Ser Asn Leu Leu Phe Asn Phe Asn Gln Glu
 275 280 285
 Ile Met Asp Ser Ile Tyr Glu Asn Phe Thr Ala Glu Lys Ile Ser Ile Ser
 290 295 300 305
 Glu Ser Ile Lys Lys Ile Lys Ala Gln Ile Ile Asp Glu Leu Phe Ser Tyr
 310 315 320
 Glu Val Lys Arg Leu Ala Ser Gln Leu Gly Ile Ser Tyr Asp Ile Leu Arg
 325 330 335 340
 Asp Tyr Leu Ser Cys Ile Asp Val Tyr Arg Thr Tyr Ala Asn Gln Ile Val
 345 350 355
 Lys Glu Cys Asp Lys Thr Asn Glu Ile Glu Glu Ala Thr Lys Arg Asn Pro
 360 365 370
 Glu Ala Tyr Thr Lys Leu Gln Gln Tyr Met Pro Ala Val Tyr Ala Lys Ala
 375 380 385 390
 Tyr Glu Asp Thr Phe Leu Phe Arg Tyr Asn Arg Leu Ile Ser Ile Asn Glu
 395 400 405
 Val Gly Ser Asp Leu Arg Tyr Tyr Lys Ile Ser Pro Asp Gln Phe His Val
 410 415 420 425
 Phe Asn Gln Lys Arg Arg Gly Lys Ile Thr Leu Asn Ala Thr Ser Thr His
 430 435 440
 Asp Thr Lys Phe Ser Glu Asp Val Arg Met Lys Ile Ser Val Leu Ser Glu
 445 450 455
 Phe Pro Glu Glu Trp Lys Asn Lys Val Glu Glu Trp His Ser Ile Ile Asn
 460 465 470 475
 Pro Lys Val Ser Arg Asn Asp Glu Tyr Arg Tyr Tyr Gln Val Leu Val Gly
 480 485 490
 Ser Phe Tyr Glu Gly Phe Ser Asn Asp Phe Lys Glu Arg Ile Lys Gln His
 495 500 505 510
 Met Ile Lys Ser Val Arg Glu Ala Lys Ile Asn Thr Ser Trp Arg Asn Gln
 515 520 525

| | | |
|---|---|-----|
| 31 | Asn Lys Glu Tyr Glu Asn Arg Val Met Glu Leu Val Glu Glu Thr Phe Thr | 32 |
| 530 | 535 | 540 |
| Asn Lys Asp Phe Ile Lys Ser Phe Met Lys Phe Glu Ser Lys Ile Arg Arg | | |
| 545 | 550 | 555 |
| Ile Gly Met Ile Lys Ser Leu Ser Leu Val Ala Leu Lys Ile Met Ser Ala | | |
| 565 | 570 | 575 |
| Gly Ile Pro Asp Phe Tyr Gln Gly Thr Glu Ile Trp Arg Tyr Leu Leu Thr | | |
| 580 | 585 | 590 |
| Asp Pro Asp Asn Arg Val Pro Val Asp Phe Lys Lys Leu His Glu Ile Leu | | |
| 600 | 605 | 610 |
| Glu Lys Ser Lys Lys Phe Glu Lys Asn Met Leu Glu Ser Met Asp Asp Gly | | |
| 615 | 620 | 625 |
| Arg Ile Lys Met Tyr Leu Thr Tyr Lys Leu Leu Ser Leu Arg Lys Gln Leu | | |
| 630 | 635 | 640 |
| Ala Glu Asp Phe Leu Lys Gly Glu Tyr Lys Gly Leu Asp Leu Glu Glu Gly | | |
| 650 | 655 | 660 |
| Leu Cys Gly Phe Ile Arg Phe Asn Lys Ile Leu Val Ile Ile Lys Thr Lys | | |
| 665 | 670 | 675 |
| Gly Ser Val Asn Tyr Lys Leu Lys Leu Glu Glu Gly Ala Ile Tyr Thr Asp | | |
| 685 | 690 | 695 |
| Val Leu Thr Gly Glu Glu Ile Lys Lys Glu Val Gln Ile Asn Glu Leu Pro | | |
| 700 | 705 | 710 |
| Arg Ile Leu Val Arg Met | | |
| 715 | 720 | |

【 0 1 0 5 】 配列番号 : 2

配列の型 : 核酸

配列の長さ : 2160

配列

```

GTGATATCAG CAACCTACAG ATTACAGTTA AATAAGAATT TTAATTTTGG TGACGTAATC 60
GATAACCTAT GGTATTTTAA GGATTTAGGA GTTCCCATC TCTACCTCTC TCCTGTCTTA 120
ATGGCTTCGC CAGGAAGTAA CCATGGGTAC GATGTAATAG ATCATTCAAG GATAAACGAT 180
GAACTTGGAG GAGAGAAAGA ATACAGGAGA TTAATAGAGA CAGCTCATAC TATTGGATTA 240
GGTATTATAC AGGACATAGT ACCAAATCAC ATGGCTGTAA ATTCTCTAAA TTGGCGACTA 300
ATGGATGTAT TAAAAATGGG TAAAAAGACT AAATATTATA CGTACTTTGA CTTTTTCCCA 360
GAAGATGATA AGATACGATT ACCCATATTA GGAGAAGATT TAGATACAGT GATAAGTAAA 420
GGTTTATTA AGATAGTAAA AGATGGAGAT GAATATTTCC TAGAATATTT CAAATGGAAA 480
CTTCCTCTAA CAGAGGTTGG AAATGATATA TACGACACTT TACAAAAACA GAATTATACC 540
CTAATGTCTT GGAAAAATCC TCCTAGCTAT AGACGATTCT TCGATGTAA TACTTTAATA 600
GGAGTAAATG TCGAAAAAGA TCACGTATTT CAAGAGTCCC ATTCAAAGAT CTTAGATTTA 660
GATGTTGATG GCTATAGAAT TGATCATATT GATGGATTAT ATGATCCTGA GAAATATATT 720
AATGACCTGA GGTCAATAAT TAAAAATAAA ATAATTATTG TAGAAAAAAT TCTGGGATTT 780
CAGGAGGAAT TAAATTTAAA TTCAGATGGA ACTACAGGAT ATGACTTCTT AAATTACTCC 840
AACTTACTGT TTAATTTTAA TCAAGAGATA ATGGACAGTA TATATGAGAA TTTCACAGCG 900
GAGAAAATAT CTATAAGTGA AAGTATAAAG AAAATAAAG CGCAAATAAT TGATGAGCTA 960
TTTAGTTATG AAGTTAAAAG ATTAGCATCA CAACTAGGAA TTAGCTACGA TATATTGAGA 1020
GATTACCTTT CTTGTATAGA TGTGTACAGA ACTTATGCTA ATCAGATTGT AAAAGACTGT 1080
GATAAGACCA ATGAGATAGA GGAAGCAACC AAAAGAAATC CAGAGGCTTA TACTAAATTA 1140
CAACAATATA TGCCAGCAGT ATACGCTAAA GCTTATGAAG ATACTTTCCT CTTTAGATAC 1200
AATAGATTAA TATCCATAAA TGAGGTGGA AGCGATTAC GATATTATAA GATATCGCCT 1260
GATCAGTTTC ATGTATTTAA TCAAAACGA AGAGGAAAA TCACACTAAA TGCCACTAGC 1320
ACACATGATA CTAAGTTTAG TGAAGATGTA AGGATGAAAA TAAGTGATT AAGTGAATTT 1380

```

33

34

CCTGAAGAAT GGAAAAATAA GGTGAGGAA TGGCATAGTA TCATAAATCC AAAGGTATCA 1440
 AGAAATGATG AATATAGATA TTATCAGGTT TTAGTGGGAA GTTTTATGA GGGATTCTCT 1500
 AATGATTTTA AGGAGAGAAT AAAGCAACAT ATGATAAAA GTGTCAGAGA AGCTAAGATA 1560
 AATACCTCAT GGAGAAATCA AAATAAGAA TATGAAAATA GAGTAATGGA ATTAGTGGAA 1620
 GAAACTTTTA CCAATAAGGA TTTCATTAAA AGTTTCATGA AATTTGAAAG TAAGATAAGA 1680
 AGGATAGGGA TGATTAAGAG CTTATCCTTG GTCGCATTAA AAATTATGTC AGCCGGTATA 1740
 CCTGATTTTT ATCAGGGAAC AGAAATATGG CGATATTTAC TTACAGATCC AGATAACAGA 1800
 GTCCAGTGG ATTTAAGAA ATTACACGAA ATATTAGAAA AATCCAAAAA ATTTGAAAAA 1860
 AATATGTTAG AGTCTATGGA CGATGGAAGA ATTAAGATGT ATTTAACATA TAAGCTTTTA 1920
 TCCCTAAGAA AACAGTTGGC TGAGGATTTT TTAAGGGCG AGTATAAGGG ATTAGATCTA 1980
 GAAGAAGGAC TATGTGGGTT TATTAGTTT AACAAAATT TGGTAATAAT AAAACCAAG 2040
 GGAAGTGTTA ATTACAACT GAACTTGAA GAGGGAGCAA TTTACACAGA TGTATTGACA 2100
 GGAGAAGAAA TTAATAAAGA GGTACAGATT AATGAGCTAC CTAGGATACT AGTTAGAATG 2160

【0106】配列番号:3

トポロジー:直鎖状

配列の長さ:30

配列の種類:ペプチド

配列の型:アミノ酸

フラグメントの種類:N末端フラグメント

配列

Met Ile Ser Ala Thr Tyr Arg Leu Gln Leu Asn Lys Asn Phe Asn Phe
 1 5 10 15
 Gly Asp Val Ile Asp Asn Leu Trp Tyr Phe Lys Asp Leu Gly
 20 25 30

【0107】配列番号:4

トポロジー:直鎖状

配列の長さ:11

配列の種類:ペプチド

配列の型:アミノ酸

フラグメントの種類:中間部フラグメント

配列

Val Glu Glu Trp His Ser Ile Ile Asn Pro Lys
 1 5 10

【0108】配列番号:5

配列の種類:Genomic DNA

配列の長さ:2160

配列の特徴

配列の型:核酸

30 起源

鎖の数:二本鎖

生物名:スルフォルプス・アシドカルダリウス

トポロジー:直鎖状

株名:ATCC33909

配列

GTG ATA TCA GCA ACC TAC AGA TTA CAG TTA AAT AAG AAT TTT AAT TTT 48
 Met Ile Ser Ala Thr Tyr Arg Leu Gln Leu Asn Lys Asn Phe Asn Phe
 1 5 10 15
 GGT GAC GTA ATC GAT AAC CTA TGG TAT TTT AAG GAT TTA GGA GTT TCC 96
 Gly Asp Val Ile Asp Asn Leu Trp Tyr Phe Lys Asp Leu Gly Val Ser
 20 25 30
 CAT CTC TAC CTC TCT CCT GTC TTA ATG GCT TCG CCA GGA AGT AAC CAT 144
 His Leu Tyr Leu Ser Pro Val Leu Met Ala Ser Pro Gly Ser Asn His
 35 40 45
 GGG TAC GAT GTA ATA GAT CAT TCA AGG ATA AAC GAT GAA CTT GGA GGA 192
 Gly Tyr Asp Val Ile Asp His Ser Arg Ile Asn Asp Glu Leu Gly Gly
 50 55 60
 GAG AAA GAA TAC AGG AGA TTA ATA GAG ACA GCT CAT ACT ATT GGA TTA 240
 Glu Lys Glu Tyr Arg Arg Leu Ile Glu Thr Ala His Thr Ile Gly Leu
 65 70 75 80
 GGT ATT ATA CAG GAC ATA GTA CCA AAT CAC ATG GCT GTA AAT TCT CTA 288
 Gly Ile Ile Gln Asp Ile Val Pro Asn His Met Ala Val Asn Ser Leu

| 35 | | 85 | 90 | 95 | 36 |
|---|--|-----|----|-----|------|
| AAT TGG CGA CTA ATG GAT GTA TTA AAA ATG GGT AAA AAG AGT AAA TAT | | | | | 336 |
| Asn Trp Arg Leu Met Asp Val Leu Lys Met Gly Lys Lys Ser Lys Tyr | | | | | |
| 100 | | 105 | | 110 | |
| TAT ACG TAC TTT GAC TTT TTC CCA GAA GAT GAT AAG ATA CGA TTA CCC | | | | | 384 |
| Tyr Thr Tyr Phe Asp Phe Phe Pro Glu Asp Asp Lys Ile Arg Leu Pro | | | | | |
| 115 | | 120 | | 125 | |
| ATA TTA GGA GAA GAT TTA GAT ACA GTG ATA AGT AAA GGT TTA TTA AAG | | | | | 432 |
| Ile Leu Gly Glu Asp Leu Asp Thr Val Ile Ser Lys Gly Leu Leu Lys | | | | | |
| 130 | | 135 | | 140 | |
| ATA GTA AAA GAT GGA GAT GAA TAT TTC CTA GAA TAT TTC AAA TGG AAA | | | | | 480 |
| Ile Val Lys Asp Gly Asp Glu Tyr Phe Leu Glu Tyr Phe Lys Trp Lys | | | | | |
| 145 | | 150 | | 155 | |
| CTT CCT CTA ACA GAG GTT GGA AAT GAT ATA TAC GAC ACT TTA CAA AAA | | | | | 528 |
| Leu Pro Leu Thr Glu Val Gly Asn Asp Ile Tyr Asp Thr Leu Gln Lys | | | | | |
| 165 | | 170 | | 175 | |
| CAG AAT TAT ACC CTA ATG TCT TGG AAA AAT CCT CCT AGC TAT AGA CGA | | | | | 576 |
| Gln Asn Tyr Thr Leu Met Ser Trp Lys Asn Pro Pro Ser Tyr Arg Arg | | | | | |
| 180 | | 185 | | 190 | |
| TTC TTC GAT GTT AAT ACT TTA ATA GGA GTA AAT GTC GAA AAA GAT CAC | | | | | 624 |
| Phe Phe Asp Val Asn Thr Leu Ile Gly Val Asn Val Glu Lys Asp His | | | | | |
| 195 | | 200 | | 205 | |
| GTA TTT CAA GAG TCC CAT TCA AAG ATC TTA GAT TTA GAT GTT GAT GGC | | | | | 672 |
| Val Phe Gln Glu Ser His Ser Lys Ile Leu Asp Leu Asp Val Asp Gly | | | | | |
| 210 | | 215 | | 220 | |
| TAT AGA ATT GAT CAT ATT GAT GGA TTA TAT GAT CCT GAG AAA TAT ATT | | | | | 720 |
| Tyr Arg Ile Asp His Ile Asp Gly Leu Tyr Asp Pro Glu Lys Tyr Ile | | | | | |
| 225 | | 230 | | 235 | |
| AAT GAC CTG AGG TCA ATA ATT AAA AAT AAA ATA ATT ATT GTA GAA AAA | | | | | 768 |
| Asn Asp Leu Arg Ser Ile Ile Lys Asn Lys Ile Ile Ile Val Glu Lys | | | | | |
| 245 | | 250 | | 255 | |
| ATT CTG GGA TTT CAG GAG GAA TTA AAA TTA AAT TCA GAT GGA ACT ACA | | | | | 816 |
| Ile Leu Gly Phe Gln Glu Glu Leu Lys Leu Asn Ser Asp Gly Thr Thr | | | | | |
| 260 | | 265 | | 270 | |
| GGA TAT GAC TTC TTA AAT TAC TCC AAC TTA CTG TTT AAT TTT AAT CAA | | | | | 864 |
| Gly Tyr Asp Phe Leu Asn Tyr Ser Asn Leu Leu Phe Asn Phe Asn Gln | | | | | |
| 275 | | 280 | | 285 | |
| GAG ATA ATG GAC AGT ATA TAT GAG AAT TTC ACA GCG GAG AAA ATA TCT | | | | | 912 |
| Glu Ile Met Asp Ser Ile Tyr Glu Asn Phe Thr Ala Glu Lys Ile Ser | | | | | |
| 290 | | 295 | | 300 | |
| ATA AGT GAA AGT ATA AAG AAA ATA AAA GCG CAA ATA ATT GAT GAG CTA | | | | | 960 |
| Ile Ser Glu Ser Ile Lys Lys Ile Lys Ala Gln Ile Ile Asp Glu Leu | | | | | |
| 305 | | 310 | | 315 | |
| TTT AGT TAT GAA GTT AAA AGA TTA GCA TCA CAA CTA GGA ATT AGC TAC | | | | | 1008 |
| Phe Ser Tyr Glu Val Lys Arg Leu Ala Ser Gln Leu Gly Ile Ser Tyr | | | | | |
| 325 | | 330 | | 335 | |
| GAT ATA TTG AGA GAT TAC CTT TCT TGT ATA GAT GTG TAC AGA ACT TAT | | | | | 1056 |
| Asp Ile Leu Arg Asp Tyr Leu Ser Cys Ile Asp Val Tyr Arg Thr Tyr | | | | | |
| 340 | | 345 | | 350 | |
| GCT AAT CAG ATT GTA AAA GAG TGT GAT AAG ACC AAT GAG ATA GAG GAA | | | | | 1104 |

37
 Ala Asn Gln Ile Val Lys Glu Cys Asp Lys Thr Asn Glu Ile Glu Glu
 355 360 365
 GCA ACC AAA AGA AAT CCA GAG GCT TAT ACT AAA TTA CAA CAA TAT ATG 1152
 Ala Thr Lys Arg Asn Pro Glu Ala Tyr Thr Lys Leu Gln Gln Tyr Met
 370 375 380
 CCA GCA GTA TAC GCT AAA GCT TAT GAA GAT ACT TTC CTC TTT AGA TAC 1200
 Pro Ala Val Tyr Ala Lys Ala Tyr Glu Asp Thr Phe Leu Phe Arg Tyr
 385 390 395 400
 AAT AGA TTA ATA TCC ATA AAT GAG GTT GGA AGC GAT TTA CGA TAT TAT 1248
 Asn Arg Leu Ile Ser Ile Asn Glu Val Gly Ser Asp Leu Arg Tyr Tyr
 405 410 415
 AAG ATA TCG CCT GAT CAG TTT CAT GTA TTT AAT CAA AAA CGA AGA GGA 1296
 Lys Ile Ser Pro Asp Gln Phe His Val Phe Asn Gln Lys Arg Arg Gly
 420 425 430
 AAA ATC ACA CTA AAT GCC ACT AGC ACA CAT GAT ACT AAG TTT AGT GAA 1344
 Lys Ile Thr Leu Asn Ala Thr Ser Thr His Asp Thr Lys Phe Ser Glu
 435 440 445
 GAT GTA AGG ATG AAA ATA AGT GTA TTA AGT GAA TTT CCT GAA GAA TGG 1392
 Asp Val Arg Met Lys Ile Ser Val Leu Ser Glu Phe Pro Glu Glu Trp
 450 455 460
 AAA AAT AAG GTC GAG GAA TGG CAT AGT ATC ATA AAT CCA AAG GTA TCA 1440
 Lys Asn Lys Val Glu Glu Trp His Ser Ile Ile Asn Pro Lys Val Ser
 465 470 475 480
 AGA AAT GAT GAA TAT AGA TAT TAT CAG GTT TTA GTG GGA AGT TTT TAT 1488
 Arg Asn Asp Glu Tyr Arg Tyr Tyr Gln Val Leu Val Gly Ser Phe Tyr
 485 490 495
 GAG GGA TTC TCT AAT GAT TTT AAG GAG AGA ATA AAG CAA CAT ATG ATA 1536
 Glu Gly Phe Ser Asn Asp Phe Lys Glu Arg Ile Lys Gln His Met Ile
 500 505 510
 AAA AGT GTC AGA GAA GCT AAG ATA AAT ACC TCA TGG AGA AAT CAA AAT 1584
 Lys Ser Val Arg Glu Ala Lys Ile Asn Thr Ser Trp Arg Asn Gln Asn
 515 520 525
 AAA GAA TAT GAA AAT AGA GTA ATG GAA TTA GTG GAA GAA ACT TTT ACC 1632
 Lys Glu Tyr Glu Asn Arg Val Met Glu Leu Val Glu Glu Thr Phe Thr
 530 535 540
 AAT AAG GAT TTC ATT AAA AGT TTC ATG AAA TTT GAA AGT AAG ATA AGA 1680
 Asn Lys Asp Phe Ile Lys Ser Phe Met Lys Phe Glu Ser Lys Ile Arg
 545 550 555 560
 AGG ATA GGG ATG ATT AAG AGC TTA TCC TTG GTC GCA TTA AAA ATT ATG 1728
 Arg Ile Gly Met Ile Lys Ser Leu Ser Leu Val Ala Leu Lys Ile Met
 565 570 575
 TCA GCC GGT ATA CCT GAT TTT TAT CAG GGA ACA GAA ATA TGG CGA TAT 1776
 Ser Ala Gly Ile Pro Asp Phe Tyr Gln Gly Thr Glu Ile Trp Arg Tyr
 580 585 590
 TTA CTT ACA GAT CCA GAT AAC AGA GTC CCA GTG GAT TTT AAG AAA TTA 1824
 Leu Leu Thr Asp Pro Asp Asn Arg Val Pro Val Asp Phe Lys Lys Leu
 595 600 605
 CAC GAA ATA TTA GAA AAA TCC AAA AAA TTT GAA AAA AAT ATG TTA GAG 1872
 His Glu Ile Leu Glu Lys Ser Lys Lys Phe Glu Lys Asn Met Leu Glu
 610 615 620

39
TCT ATG GAC GAT GGA AGA ATT AAG ATG TAT TTA ACA TAT AAG CTT TTA 1920
Ser Met Asp Asp Gly Arg Ile Lys Met Tyr Leu Thr Tyr Lys Leu Leu
625 630 635 640
TCC CTA AGA AAA CAG TTG GCT GAG GAT TTT TTA AAG GGC GAG TAT AAG 1968
Ser Leu Arg Lys Gln Leu Ala Glu Asp Phe Leu Lys Gly Glu Tyr Lys
645 650 655
GGA TTA GAT CTA GAA GAA GGA CTA TGT GGG TTT ATT AGG TTT AAC AAA 2016
Gly Leu Asp Leu Glu Glu Gly Leu Cys Gly Phe Ile Arg Phe Asn Lys
660 665 670
ATT TTG GTA ATA ATA AAA ACC AAG GGA AGT GTT AAT TAC AAA CTG AAA 2064
Ile Leu Val Ile Ile Lys Thr Lys Gly Ser Val Asn Tyr Lys Leu Lys
675 680 685
CTT GAA GAG GGA GCA ATT TAC ACA GAT GTA TTG ACA GGA GAA GAA ATT 2112
Leu Glu Glu Gly Ala Ile Tyr Thr Asp Val Leu Thr Gly Glu Glu Ile
690 695 700
AAA AAA GAG GTA CAG ATT AAT GAG CTA CCT AGG ATA CTA GTT AGA ATG 2160
Lys Lys Glu Val Gln Ile Asn Glu Leu Pro Arg Ile Leu Val Arg Met
705 710 715 720

【図面の簡単な説明】

【図1】スルフォロブス・アシドカルダリウス (ATC C 3 3 9 0 9) が産生する耐熱性酵素の至適温度を示す図である。

【図2】スルフォロブス・アシドカルダリウス (ATC C 3 3 9 0 9) が産生する耐熱性酵素の至適 pH を示す図である。

【図3】スルフォロブス・アシドカルダリウス (ATC C 3 3 9 0 9) が産生する耐熱性酵素の熱安定性を示す

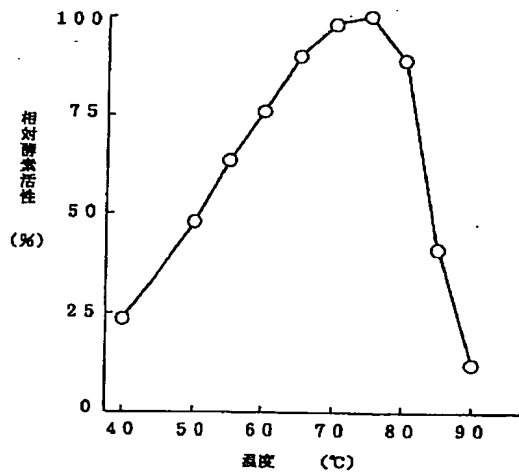
図である。

【図4】スルフォロブス・アシドカルダリウス (ATC C 3 3 9 0 9) が産生する耐熱性酵素の pH 安定性を示す図である。

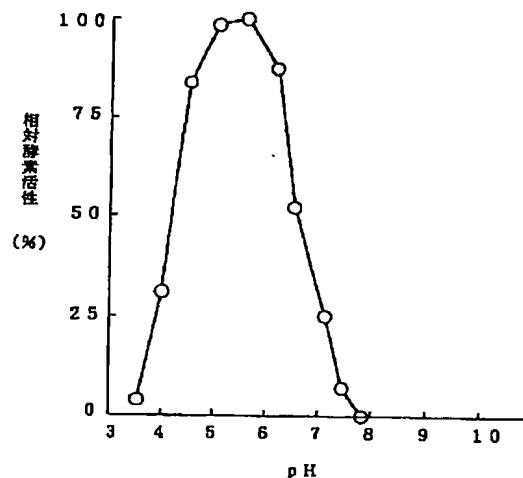
【図5】この発明による組換え DNA である pST35 の制限酵素地図である。

【図6】この発明による組換え DNA である pST36 の制限酵素地図である。

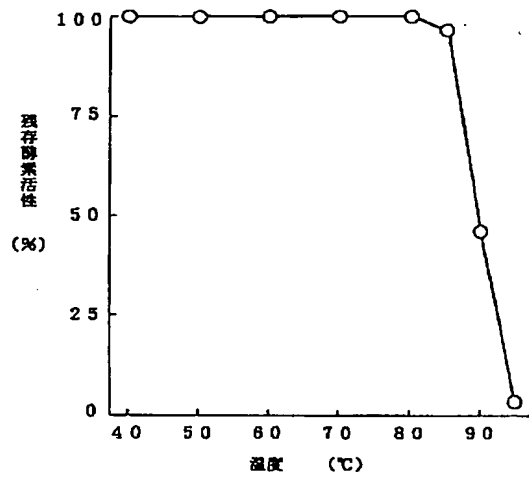
【図1】



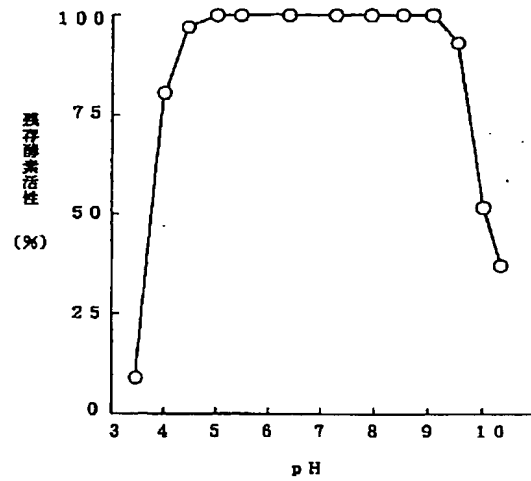
【図2】



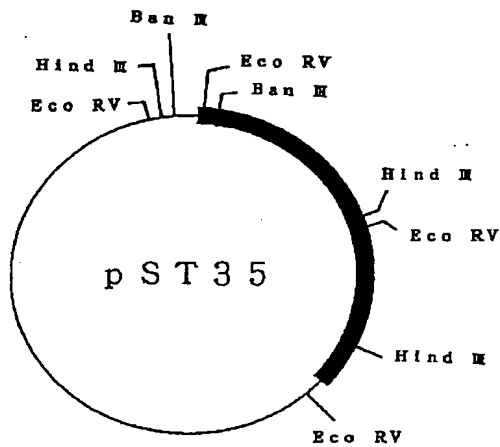
【図 3】



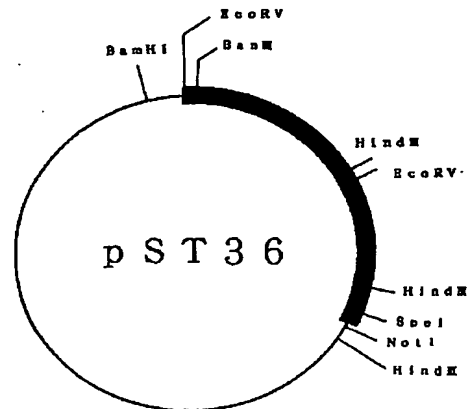
【図 4】



【図 5】



【図 6】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶

15/09

C12P 19/14

// (C12N 9/24

C12R 1:19)

(C12N 1/21

C12R 1:19)

(C12N 15/09

C12R 1:01)

識別記号

ZNA

庁内整理番号

Z 7432-4B

F I

技術表示箇所

ZNA

9281-4B

C12N 15/00

(C12N 15/00

C12R 1:01)

ZNA

A

ZNA

A